Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Untersuchungen zum Nachweis von medikamentös-induzierten allergischen Erkrankungen und zum Einfluß von Medikamenten auf Immunreaktionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
GUO-JUN DIAO
aus Shanghai
V. R. China

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543907_0047

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Untersuchungen zum Nachweis von medikamentös-induzierten allergischen Erkrankungen und zum Einfluß von Medikamenten auf Immunreaktionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
GUO-JUN DIAO
aus Shanghai
V. R. China

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Dölle

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P.A. Berg an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung II, die von Herrn Prof. Dr. H.D. Waller geleitet wird.

Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit Unterstützung des Erziehungsministeriums der Volksrepublik China.

Herrn Prof. Dr. P.A. Berg möchte ich sehr herzlich danken für die Anregung zu diesem Thema, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, für seine Unterstützung sowie für die wertvollen Diskussionen.

Besonders danke ich Herrn Dr. N. Brattig, ohne dessen sachkundige Anleitung, dessen weiterführende Ratschläge und Beratungen die vorliegende Arbeit nicht in dieser Weise hätte entstehen können.

Frau M. Dürnay möchte ich für die perfekt gezeichneten Abbildungen und photographischen Arbeiten danken.

Ferner danke ich der Zyma GmbH, München, für Interesse und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	5
1.	Patienten	5
2.	Material	5
2.1.	Reagenzien	5
2.1.1.	Medien und Puffer	5
2.1.2.	Mitogene, Antigene	6
2.1.3.	Seren und Serumproteine	6
2.1.4.	Chemikalien und andere Reagenzien	7
2.2.	Geräte und weiteres Material	7
3.	Methoden	8
3.1.	Lymphozytenisolierung	8
3.2.	Zellkultur	8
3.3.	Nachweis medikamentös-allergischer Reaktionen	9
3.3.1.	Präparation von "Medikament-Antigen"	9
3.3.1.1.	Medikament/Wirkstoff-Verdünnungen	10
3.3.1.2.	Gewinnung "Medikament/Metabolit-haltiger" Seren	12
3.3.2.	"Medikament-Antigen"-induzierte Lymphozytenproliferation	12
3.4.	Lymphozytenfunktionstests	12
3.4.1.	Spontane Lymphozytenproliferation	12
3.4.2.	Mitogen-induzierte Proliferation	13
3.4.3.	Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)	13
3.4.4.	Antigen-induzierte Lymphozyten-proliferation	13
3.4.5.	Mitogen-induzierte T-Suppressor-zellaktivität	13
3.4.6.	Immunglobulinsynthese	14
3.5.	Bestimmung von immunsuppressiven Serumfaktoren (SIF)	15
3.6.	Bestimmung von Immunkomplexen	15

Seite

3.7. Statistische Methoden 16

4. Abkürzungen 16

C. ERGEBNISSE 18

1. Untersuchungen über arzneimittelbedingte Überempfindlichkeitsreaktionen 18

1.1. Untersuchungen bei Patienten mit Catergen((+)-Katechin)-induziertem Fieber 18

1.1.1. Klinische Befunde 18

1.1.2. Nachweis (+)-Katechin-induzierter zellulärer Immunreaktion im Lymphozytentransformationstest 19

1.2. Verlaufsstudie bei einer Patientin mit Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Pyrazolonderivaten 22

1.2.1. Kasuistik 22

1.2.2. Protokoll der Verlaufsstudie 25

1.2.3. Hauttests 27

1.2.4. Überempfindlichkeitsreaktionen nach Reexpositionen mit Pyrazolonderivaten 27

1.2.5. Nachweis spezifischer zellulärer Immunreaktionen gegenüber Propyphenazon und Aminophenazon im Lymphozytentransformationstest 29

1.2.6. Verlaufsbestimmungen nicht medikamentspezifischer zellulärer Immunreaktionen 37

2. Einfluß von Flavonoiden und anderen pharmakologischen Substanzen auf in vitro Immunreaktionen 39

2.1. Lymphozytenproliferation 39

2.1.1. Spontane Lymphozytenproliferation 40

2.1.2. Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation 42

2.1.3. Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation und gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) 44

2.2. Immunglobulinsynthese 47

2.2.1. Spontane Immunglobulinsynthese 47

Seite

2.2.2. Pokeweedmitogen-induzierte Immunglobulinsynthese 48

2.2.3. Staphylokokkus aureus Cowan I (SAC)-induzierte Immunglobulinsynthese 49

2.3. Einfluß von (+)-Katechin auf ConA-induzierte Aktivität von Suppressorzellen 51

D. DISKUSSION 54

E. ZUSAMMENFASSUNG 77

F. LITERATURVERZEICHNIS 79

A. EINLEITUNG

Vor der klinischen Verwendung der Sulfonamide im Jahre 1935 schätzte man die Häufigkeit medikamentös-induzierter Schädigungen auf 0.5 - 1.5 % der therapierten Patienten. Heute nimmt man an, daß etwa 5 % der therapierten Patienten medikamentös-induzierte Erkrankungen bekommen und bei 15 % der Patienten mindestens einmal unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen auftreten (Parker, 1980).

Die Arzneimittelnebenwirkungen lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen. In den meisten Fällen handelt es sich um vorhersagbare, sog. toxische Nebenwirkungen, die durch pharmakologische Wirkungen zustandekommen. Die zweite Gruppe stellen die Arzneimittel-induzierten allergischen Reaktionen dar, die immunologisch bedingt sind und durch sensibilisierte T-Lymphozyten und spezifische Antikörper gegen das "Medikament-Antigen" verursacht werden (DeSwarte, 1980).

Die wichtigsten Charakteristika medikamentös-allergischer Reaktionen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Charakteristika medikamentöser Allergien

1.	Dosisunabhängigkeit
2.	Akute Exazerbation nach Reexposition mit therapeutischen Dosen
3.	Unterschiedlich lange Latenzzeiten
4.	Überempfindlichkeitsreaktionen wie Urtikaria, Exanthem, Fieber und Gelenkbeschwerden
5.	Häufig anamnestische Hinweise auf atopische Allergie oder frühere medikamentös-allergische Reaktionen
6.	Geringe Inzidenz bei großem exponierten Personenkreis
7.	Fehlende Reproduzierbarkeit im Tiermodell
8.	Keine Verselbständigung der Krankheit nach Entzug des Medikamentes

Im Gegensatz zu den toxischen Nebenwirkungen treten allergische Reaktionen dosisunabhängig auf. Nach einer Reexposition werden die Überempfindlichkeitsreaktionen schnell und bereits durch geringe Arzneimitteldosen ausgelöst. Während toxische Schädigungen durch hohe Dosen des medikamentösen Wirkstoffes bei nahezu allen Individuen beobachtet werden können, entwickeln sich allergische Reaktionen nur bei einem kleinen Teil der exponierten Personen und nur nach einer individuell unterschiedlich ausgeprägten Sensibilisierungsphase (Latenzzeit). Bei diesen immunologisch bedingten Schädigungen werden in vielen Fällen begleitende Überempfindlichkeitsreaktionen wie Exantheme, Urtikaria, Fieber oder Eosinophilie beobachtet.

Ein Arzneimittel kann verschiedene Überempfindlichkeitsreaktionen hervorrufen, die nach Gell und Coombs in Typ I-IV klassifiziert werden. Als Typ I-Reaktion wird die hyperergische Sofortreaktion bezeichnet, bei der es sich um eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeit handelt. Hierbei werden in der Primärantwort via T-Helferzellen IgE-synthetisierende Plasmazellen aktiviert. Die gebildeten arzneimittel-spezifischen IgE-Antikörper binden sich an Mastzellen oder zirkulierende Basophile und induzieren nach Bindung des "Medikament-Antigens" bei erneuter Exposition eine Degranulation der Mastzellen und Freisetzung vasoaktiver Mediatoren. Der Gewebsschaden der Typ II - Überempfindlichkeit resultiert aus immunologischen Reaktionen, bei denen es zu einer Komplement-abhängigen oder zellulär (K-Zellen) bedingten Lyse von Zellen kommt, die das Medikament gebunden haben. Arzneimittel-spezifische IgG- oder IgM-Antikörper können so eine hämolytische Anämie, Thrombozytopenie oder Leukopenie auslösen. Bei der Typ III-Reaktion kommt es zu Schädigungen durch lösliche Immunkomplexe, die im Antigenüberschuß zirkulieren. Penicillin kann z.B. Serumkrankheit-ähnliche Symptome hervorrufen. Es kann bei dieser Reaktion auch eine Komplement-Aktivierung und Thrombozytenaggregation eintreten.

Während die Typ I-Reaktion innerhalb von Minuten nach Medikamentexposition eintritt (Sofortreaktion), Typ II- und Typ III-

Reaktionen innerhalb Stunden manifest werden, beträgt die Reaktionszeit bei der Typ IV-Überempfindlichkeit 1-3 Tage. Diese Spätreaktion wird durch spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten verursacht, die mit dem Allergen direkt reagieren und Lymphokine freisetzen. Hierzu gehört die Bildung von Quaddeln an der Haut durch Infiltration von Lymphozyten oder eine Fieberreaktion durch Sekretion von endogenem Pyrogen. In vielen Vällen treten diese verschiedenen Reaktionstypen nicht isoliert, sondern oft gleichzeitig auf (Halpern et al., 1967; Kownatzki, 1981; Raab,1974).

Die diagnostischen Möglichkeiten zur Sicherung einer Medikamenten-Allergie sind bisher begrenzt. Die Haut- und Provokationstests sind nicht immer ungefährlich und deren Aussage ist beschränkt. Ziel dieser Arbeit ist, die Sensibilität und Spezifität des Lymphozytentransformationstests (LTT) zu demonstrieren, dessen Prinzip es ist, eine Proliferation sensibilisierter Lymphozyten durch Kontakt mit dem spezifischen Antigen auszulösen.

Der Nachweis spezifisch-sensibilisierter Lymphozyten im peripheren Blut von Patienten mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf Medikamente mit Hilfe des Lymphozytentransformationstests (LTT) ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden (Amos, 1980; Backer et al., 1974; Halpern et al., 1967; Mathews et al., 1972;Namihisa et al., 1975; Paronetto + Popper, 1970; Pearsall et al., 1974, Sheffer et al., 1975; Warrington et al., 1978; Warrington + Tse, 1979). Andere Autoren konnten nur bei wenigen Patienten mit Verdacht auf medikamentöse Allergie erhöhte Proliferationsraten der Lymphozyten beobachten (Bruce + Raymon, 1972; Davies + Holmes, 1972; Sarkany, 1967).

Um eine Zusammenstellung einer Vielzahl von Einzeluntersuchungen zu vermeiden, wird die Wertigkeit des LTT an einer Gruppe von Patienten mit Catergen((+)-Katechin)-induziertem Fieber sowie an einer Einzelperson mit bekannter Pyrazolon-Überempfindlichkeit dargestellt, wobei im letzten Fall die immunologischen Reaktionen vor und nach Reexpositionen bestimmt wurden.

In einem zweiten Teil der Arbeit wird versucht, der Frage nachzugehen, inwieweit Medikamente selbst auf Immunreaktionen Einfluß nehmen. So fanden wir, daß die T-Lymphozytenfunktionen nach Einnahme von Phenopyrazon vorübergehend stark erniedrigt sind (Brattig et al., 1981), ähnlich wie nach Einnahme anderer Analgetika beobachtet wurde (Crout et al., 1975). In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Arzneimittel stimulierend oder suppressiv auf das Immunsystem einwirken (Hadden et al., 1975; Hadden et al., 1976; Lipsky + Ziff, 1978; Lipsky + Ziff, 1980; Leoni et al., 1978; Renoux, 1978; White et al., 1979; Wybran et al., 1978).

In einer Untersuchungsreihe wurde daher der Einfluß von Flavonoiden und Ubichinon auf in vitro Lymphozytenfunktionen bei gesunden Individuen bestimmt und mit dem Effekt von Cyclosporin A, das immunsuppressiv wirkt (Introna et al., 1981; Paavonen + Hayry, 1980; Wang et al., 1981; White et al., 1979), sowie von Inosin, das immunstimulierende Aktivität aufweist (Hadden et al., 1976; Touraine et al., 1979; Wybran et al., 1978), verglichen.

B. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

1. Patienten

Untersucht wurden 14 Patienten (11 männlich, 3 weiblich) mit Catergen((+)-Katechin, (+)-Cyanidanol-3)-induziertem Fieber. Das Alter lag zwischen 11 Monaten und 83 Jahren, im Mittel 42 ± 16 Jahre. Zwei der Patienten hatten eine akute B-Hepatitis, ein Patient eine protrahiert verlaufende Hepatitis, ein Patient eine HBsAg-negative chronisch-aktive Hepatitis und 10 Patienten einen alkoholisch-toxischen Leberschaden. 8 Patienten wurden mit 1-2 g (+)Cyanidanol-3 reexponiert, einer von ihnen 5 mal, wobei alle Patienten mit dem Provokationstest einverstanden waren und über mögliche Nebenwirkungen informiert waren.

Ferner wurde die Patientin R.K., geb. 27.12.59, untersucht, bei der anamnestisch Verdacht auf eine Pyrazolonallergie bestand. Die Verlaufsuntersuchungen wurden parallel bei einer gesunden Probandin, B.R., geb. 18.2.57, durchgeführt.

Als Kontrolle dienten 16 gesunde Blutspender im Alter von 22 - 56 Jahre (mittleres Alter 35 ± 12), 8 männlich, 8 weiblich.

2. Material

2.1. Reagenzien

2.1.1. Medien und Puffer

- RPMI 1640, Gibco Laboratories (Kat. Nr. 240)
- Iscove's Medium, Flow Labs (Kat. Nr. 73-164-49)
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Flow Labs (Kat. Nr. 3-002)

2.1.2 Mitogene, Antigene

- Phytohämagglutinin-P (PHA), Difco-Laboratories, Detroit, Michigan, USA (Kat. Nr. 3110-56)
- Concanavalin A (ConA), Serva Feinchemica (Kat. Nr. 17475M)
- Concanavalin A, Difco-Labs. (Kat. Nr. 3351-57-1)
- Pokeweedmitogen (PWM), Grand Island Biological Company (Gibco), Grand Island, USA (Kat. Nr. 536)
- Ubiquitäre Antigene (Mischantigen: Tuberkulin, Tetanol, Streptolysin, Mumps, Vaccinia) wurde freundlicherweise von Dr. Johannsen (Behringwerke) zur Verfügung gestellt.
- Staphylokokkus aureus Cowan I wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Bessler und Dr. Handtke zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Seren und Serumproteine

- Foetales Kälberserum (FCS), Seromed^{R} (Kat. Nr. 0115)
- Normalserum-Pool von 6 gesunden Blutspendern
- Kaninchen anti-human-IgG-Immunglobulinfraktion, Boehringer Ingelheim (Kat. Nr. A090)
- Kaninchen anti-human-IgG Fluorescein-Konjugat, Boehringer Ingelheim (Kat. Nr. F202)
- Kaninchen anti-human-IgM-Immunglobulinfraktion, Boehringer Ingelheim (Kat. Nr. 10-091)
- Kaninchen anti-human-IgM Fluorescein-Konjugat, Boehringer Ingelheim (Kat. Nr. F203)
- $F(ab)_2$-anti-IgG-Lösung, Tago, Inc., Burlingame, CA, USA (Kat. Nr. 4200)
- C_{1q}, Behringwerke (Kat. Nr. 220580)

2.1.4. Chemikalien und andere Reagenzien

- Glutamin, Flow Labs. (Kat. Nr. 16-801-48)
- Gentamycin, Flow Labs (Kat. Nr. 16-762-45)
- Mitomycin, Sigma (Kat. Nr. M-0503)
- α-Methylmannosid, Sigma (Kat. Nr. M-6882)
- Lymphoprep, Nyegaard, Oslo, Norwegen
- (6-^{3}H)-Thymidin, spez. Aktivität 2 Ci/mM, Amersham-Buchler, Braunschweig (Kat. Nr. TRA 306)

2.2. Geräte und weiteres Material

- Millipore Filter 0.45 µm, Millipore Corp., Frankfurt
- Plastikröhrchen (50 ml), Falcon Plastics, Becton and Dickinson, Oxnard, Californien, USA (Kat. Nr. 2070)
- Mikrotitrierplatten, System Cooke, Greiner (Kat. Nr. M220-24 ART)
- Zellkultursammler, Titertek-Skatron AS, Lierbyen, Norwegen
- Flüssigkeitsszintillationszähler Isocap 300, Nuclear Chikago
- Einmalpipetten 10 ml, Falcon (Kat. Nr. 7530)
- Polyäthylenzählfläschchen, Zinsser (Kat. Nr. 714)
- Hamiltonspritze von Fischer, Frankfurt (TLL, Kat. Nr. 81420, 1002N)
- Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company Canbury Connecticut USA
- Zentrifuge Rotixa, Hettich, Tuttlingen
- Szintillationsflüssigkeit (Quickszint) 501, Zinsser, Frankfurt (Kat. Nr. 16808)
- Acridinorange , Merck (Kat. Nr. 1333)
- Probenträger (Stiqs), IDT-Boehringer Ingelheim (Kat. Nr. 1530)
- FIAX^{TM}-100-Fluorometer, IDT-Boehringer Ingelheim

3. Methoden

3.1. Lymphozytenisolierung

Venöses, heparinisiertes Blut (Liquemin; 50 I.E/ml) wurde mit Kochsalzlösung im Verhältnis von Blut:Kochsalzlösung = 4:1 verdünnt. Dieses verdünnte Blut wurde nach dem Überschichten einer Ficoll-Isopaquelösung der Dichte 1.077 g/ml im Verhältnis von zwei Teilen zu einem Teil Gradientenlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 600 g zentrifugiert (Böyum, 1968). Das Plasma (80 %) wurde abpipettiert und dekomplementiert (56°C; 30 Min.). Die Zellen (Periphere Blut mononukleäre Zellen, PBMC) aus der Interphase wurden viermal in Handk's Salzlösung (HBSS) gewaschen (400 g, 10 Min.), mit Hilfe einer Acridinorange (35 µg/ml) Vitalfärbung 2 - 3 mal gezählt und in Medium, das Glutamin (4 mM) und Gentamycin (100 µg/ml) enthielt, auf eine Konzentration von 4×10^6/ml eingestellt. Eine exakte Zählung der Zellen war bei der Standardisierung der Kulturtechnik von großer Bedeutung. Der Lymphozytenanteil der PBMC betrug über 80 %, und die Vitalität lag im Durchschnitt bei 95 %.

3.2. Zellkultur

Die Zellkultur wurde nach der von Yamamura (1973) und Oppenheim + Rosenstreich (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. $1 - 3 \times 10^5$ PBMC wurden in 0.2 ml Medium in Gegenwart von Mitogen, Antigen oder ohne Stimulator sowie Normalserum-Pool bei 37°C in einer feuchten, auf 5 % CO_2 eingestellten Atmosphäre 2 - 6 Tage inkubiert. 10 oder 24 Stunden vor Beendigung der jeweiligen Kulturzeit jede Kultur mit 1 µCi/ml (6-^{3}H)-Thymidin zugegeben. Nach Ablauf der Kulturdauer wurden die Zellen mit einem Zellkultursammler auf Glasfiberfilter abgesaugt und gewaschen, in Polyäthylenzählfläschchen gesammelt und getrocknet. Die in den Zellen ein-

gebaute Radioaktivität wurde nach Zugabe von 1 ml Szintillatorflüssigkeit mit Hilfe eines Flüssigkeits-Szintillationszählers gemessen und als Ausmaß der Transformation bzw. Proliferation der Kultivierten Lymphozyten gewertet.

In den Ergebnissen wurden die Mittelwerte von 3-6 fach Bestimmungen oder die Stimulationsindizes angegeben, die durch Vergleich der Einbauraten von stimulierten und nicht stimulierten Kulturansätzen errechnet wurden. Die Standardabweichungen der Parallelansätze lagen bei stark stimulierten Kulturen (Mitogen, ubiquitäre Antigene mit 10 - 50000 cpm) zwischen 7 - 17 %, bei schwach stimulierten Ansätzen (Kontrollansätze, "Medikament-Antigen" mit 200 - 6000 cpm) zwischen 10 - 60 %. Bei Untersuchungsreihen wurden alle Lösungen mit Reagenzien wie Mitogene, Antigene, Medikament- bzw. Wirkstoff-Verdünnungen, "Medikament/Metabolit-haltige" Seren sowie Normalserum-Pool zu einem Zeitpunkt in komplettem Medium mit Glutamin und Gentamyzin vorbereitet und in Mikrotiterplatten so vorpipettiert, daß an den einzelnen Testtagen nur noch frisch isolierte PBMC in Medium zugesetzt werden mußten. Die vorpipettierten Platten wurden bei -20°C eingefroren.

3.3. Nachweis medikamentös-allergischer Reaktionen

3.3.1. Präparation von "Medikament-Antigen"

Als "Medikament-Antigen"-Quelle für die Lymphozytenkulturen wurden Medikament/Wirkstoff-Verdünnungen oder "Medikament/Metabolit-haltige" Seren verwendet.

3.3.1.1. Medikament/Wirkstoff-Verdünnungen

Reinsubstanzen oder Medikamente (Tab. 2) wurden eingewogen, Stammlösungen (400 - 1000 µg/ml) in 50 % Normalserum-haltigem Medium hergestellt und in einigen Fällen ultraschallbehandelt (Sonifier B-12; 3 mal 30 Sekunden bei 300 Watt mit jeweils 15 Sekunden Unterbrechung). Verdünnungsreihen wurden so angelegt, daß die Endkonzentrationen in der Kultur zwischen 0.1 - 200 µg/ml variierten (Abb. 1). In Vorversuchen wurden Konzentrationen ausgetestet, die keine toxische Wirkung auf die Lymphozyten hatten.

Tabelle 2. Zusammenstellung der in den Untersuchungen verwendeten Medikamente bzw. Reinsubstanzen

Ilvico:	75 mg Propyphenazon	150 mg Salicylamid
	3 mg Brompheniramin	20 mg Chinin-HCl
	36 mg Ca-Ascorbat	10 mg Coffein

Propyphenazon (MG 230)
Aminophenazon (MG 231)
Phenylbutazon (MG 308)
Chinin-HCl (MG 361)
Brompheniramin (MG 320)
(+)-Katechin (MG 290, Zyma GmbH)
Methyl-Katechin (MG 305, Zyma GmbH)
Palmitoyl-Katechin (MG 528, Zyma GmbH)
Ubichinon (Ubichinon-10) (MG 863, Zyma GmbH)
Cyclosporin A (MG 1203, Sandoz, Basel)
Inosin (MG 286, Biologische und Pharmazeutische Produkte GmbH)

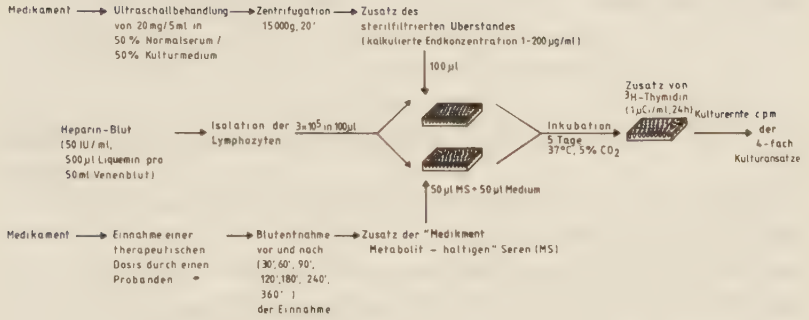


Abb. 1. Methodik des Lymphozytentransformationstests (LTT) zum Nachweis von spezifisch-sensibilisierten Lymphozyten.

Verschiedene Wirkstoffe konnten nur mit Hilfe bestimmter Lösungsmittel in Lösung gebracht werden: 8 mg CyA wurden in reinem Äthanol (1 ml 96 %) gelöst und in RPMI 1/200 - 1/20000 verdünnt, um in der Lymphozytenkultur Konzentrationen zwischen 10 - 0.1 µg/ml CyA zu erhalten. Die höchste Äthanolkonzentration in der Kultur und den Kontrollansätzen betrug 0.1 % und hatte keinen toxischen Effekt auf die Lymphozytentransformation. 12 mg Palmitoyl-Katechin (P-Kat) wurden in 3 ml RPMI gelöst, das 60 mM NaOH enthielt, und verdünnt bis zu einer Endkonzentration in der Lymphozytenkultur zwischen 1 - 100 µg/ml. Der Kultur wurden maximal 1.5 mM NaOH zugesetzt, wobei in den Kontrollansätzen ebenfalls kein toxischer Effekt auf die Lymphozytenproliferation festgestellt werden konnte. 1 mg Ubichinon wurde zunächst in 2 ml RPMI gelöst, das 12 % Äthanol enthielt. Nach Zusatz einer 5 % (w/v) Humanalbuminlösung (2 ml) bei 50°C 10 Minuten lang gerührt, ultraschallbehandelt, sterilfiltriert und anschließend verdünnt. Der Äthanolgehalt der höchsten Konzentration in der Lymphozytenkultur (10 µg/ml) betrug 0.24 %. Eine äquivalente Lö-

sung ohne Ubichinon wurde als Kontrolle verwendet und hatte keinen toxischen Effekt auf die Lymphozytenproliferation.

3.3.1.2. Gewinnung "Medikament/Metabolit-haltiger" Seren

Zur Gewinnung von "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren wurden gesunden Probanden vor bzw. 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 360 Minuten nach Einnahme eines Medikaments oder einer Reinsubstanz 10 - 15 ml Blut abgenommen (Abb. 1). Diese Seren wurden nach Hitzeinaktivierung (56°C, 30 Min.) in kleinen Portionen (1 ml) bei -20°C eingefroren.

3.3.2. "Medikament-Antigen"-induzierte Lymphozytenproliferation

3×10^5 PBMC wurden in Protein-haltigem Medium (Iscove Medium) in Gegenwart von Medikament-Verdünnungen oder "Medikament/Metabolit-haltigem" Serum 6 Tage inkubiert, wobei 3H-TdR während der letzten 24 Stunden zugesetzt wurde (Abb. 1).

3.4. Lymphozytenfunktionstests

3.4.1. Spontane Lymphozytenproliferation

3×10^5 PBMC wurden in Serum (20 %) enthaltendem Medium RPMI 1640 mit und ohne Zusatz von Wirkstoffen 3 - 6 Tage lang inkubiert und der 3H-TdR-Einbau während der letzten 24 Stunden bestimmt.

3.4.2. Mitogen-induzierte Proliferation

10^5 PBMC wurden unter Zusatz von 20 % Normalserum-Pool mit Phytohämagglutinin (PHA, 10 µg/ml), Concanavalin A (Con, 10 µg/ml), Pokeweedmitogen (PWM, 10 µg/ml) für 3 - 6 Tage stimuliert und während der letzten 10 Stunden mit 3H-TdR markiert.

3.4.3. Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

10^5 PBMC von je zwei gesunden, nicht verwandten Lymphozytenspendern wurden in einer Zwei-Weg-MLR in Gegenwart von 20 % Normalserum und Medikamentpräparationen 6 Tage lang in U-Form Mikrotiterplatten inkubiert. 24 Stunden vor Beendigung der Kulturzeit wurde 3H-TdR zugesetzt.

3.4.4. Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation

2×10^5 PBMC wurden unter Zusatz von 20 % Normalserum mit ubiquitären Antigenen (Mischantigen: Tetanus, Tuberkulin, Streptolysin, Mumps, Vaccinia) in einer Konzentration von 10 µg/ml für 6 Tage inkubiert und während der letzten 24 Stunden 3H-TdR zugesetzt.

3.4.5. Mitogen-induzierte T-Suppressorzellaktivität

Die Bestimmung der Aktivität von Suppressorzellen erfolgte nach Haynes + Fauci (1977) und Brattig + Berg (1982). Frisch isolierte PBMC wurden in einer Konzentration von 2×10^6/ml in Polypropylenröhrchen für zwei Tage in Gegenwart von 0 und 60 µg/ml Con A inkubiert (Aktivierungsphase). Bei den Unter-

suchungen über den Einfluß von Flavonoiden auf Immunreaktionen wurde die Aktivierungsphase in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 50, 100 µg/ml (+)-Katechin) durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen (Effektzellen) dreimal in HBSS, das 50 mM α-Methylmannosid enthielt, gewaschen, mit 20 gy bestrahlt und die Zahl der vitalen Zellen sowie Blasten mit Hilfe von Acridinorange bestimmt. Diese vorinkubierten Zellen wurden als Effektorzellen (EZ) (10^5/Kultur) in Gegenwart von Con A (0, 5, 25 µg/ml) mit allogenen Responderzellen (RZ) (10^5) für 3 Tage kokultiviert. Durch Vergleich der 3H-TdR-Einbauraten der Kokulturansätze mit Con A-aktivierten Effektorzellen (EZ_{ConA}) mit denjenigen Ansätzen, die vorinkubierte, aber nicht aktivierte Zellen (EZ_{RPMI}) enthielten, wurde die Aktivität als % Suppression ermittelt:

$$\% \text{ Suppression} = \left(1 - \frac{\overline{cpm}(EZ_{ConA} \times RZ)}{\overline{cpm}(EZ_{RPMI} \times RZ)}\right) \times 100$$

Als Kontrolle wurden die Responderzellen mit bestrahlten PBMC desselben Spenders kokultiviert, um den Effekt von bestrahlten Zellen auf die ConA-Stimulation der Responderzellen zu prüfen.

3.4.6. Immunglobulinsynthese

10^6 PBMC/ml wurden 7 Tage lang in einem Milieu von Iscove Medium mit fötalem Kälberserum (10 %) mit und ohne Zusatz von PWM (5 - 10 µg/ml) sowie Staphylokokkus aureus Cowan I (SAC, 200 x 10^6/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und die IgG/IgM-Konzentration in den Kulturüberständen mit Hilfe des Fluoroimmuno-Assays (FIAX) bestimmt.

Probenträger (Stiqs) mit einer Celluloseazetat-Oberfläche auf jeder Seite wurden einseitig mit anti-Human-IgG/IgM-Im-

munglobulinfraktion beschichtet, in Tween-enthaltenem Phosphatpuffer (PBS) geschüttelt, danach in den verdünnten Kulturüberständen oder IgG/IgM-Standardlösungen inkubiert, erneut in Tween-PBS gewaschen, anschließend in FITC-markiertem anti-Human-IgG/IgM Serum inkubiert und schließlich wiederum in Tween-PBS geschüttelt.

Die Menge des gebundenen FITC-markierten anti-Human-IgG/IgM wurde in einem sensiblen Fluorometer gemessen. Die Konzentration von IgG/IgM in den Kulturüberständen wurde mit Hilfe von Eichkurven definierter IgG/IgM-Konzentrationen ermittelt. Die Intra-Assay-Varianz lag bei 5 %, die Inter-Assay-Varianz lag bei 9.5 %. Mit Hilfe dieses Test-Systems konnten in den Kulturüberständen Konzentrationen von IgG/IgM zwischen 200 - 8000 ng/ml erfaßt werden.

3.5. Bestimmung von immunsuppressiven Serumfaktoren (SIF)

Die Bestimmung von SIF erfolgte nach der von Brattig + Berg (1982) beschriebenen Methodik. 10^5 PBMC gesunder Spender wurden in Gegenwart von Normalseren oder Testseren (20 %) 48 Stunden in Gegenwart von PHA (10 µg/ml) als Mitogen inkubiert und die 3H-TdR-Einbauraten in Gegenwart des Testserums mit derjenigen bei Zusatz der Kontrollseren verglichen.

3.6. Bestimmung von Immunkomplexen

Die Bestimmung von Immunkomplexen wurde nach Bartel et al. (1981) durchgeführt. Probenträger (Stiqs) wurden auf einer Seite mit 1 µg C_{1q} beschichtet und anschließend in Veronalpuffer, dem 1 % Rinderalbumin zugesetzt worden war, gewaschen. Die Stiqs wurden mit Patientenserum in einer Verdünnung von 1:35 für 30 Minuten inkubiert (20 µg Serum und 680 µg EDTA-Puffer und 0.4 % Triton X100). Die Stiqs wurden

erneut mit dem EDTA-Triton X100-Puffer für 10 Minuten gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit dem konjugierten Anti-IgG-Antikörper inkubiert. Der Antikörper wurde in einer 1:50-Verdünnung zugesetzt (15 µl der $F(ab)_2$-anti-IgG-Lösung und 735 µl Phosphatpuffer, der 1 % Rinderalbumin und 0.4 % Triton X100 enthielt). Dieser Komplex wurde erneut für 10 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte die fluorometrische Messung der gebundenen konjugierten $F(ab)_2$-Fragmente im FIAX. Aus der Differenz der Fluoreszenzsignale (FSU) zwischen der C_{1q}-beschichteten Vorderseite und der unbeschichteten Rückseite wurde die Konzentration der zirkulierenden Immunkomplexe im Serum bestimmt.

3.7. Statistische Methoden

In den Ergebnissen wurden die Mittelwerte der 3 - 6 Parallelansätze ($\bar{x}$ ± SD) angegeben und signifikante Unterschiede von zu vergleichenden Paaren mit Hilfe des Student's t-Tests ermittelt.

4. Abkürzungen

B-Zelle	Bursa-Äquivalent-abhängiger Lymphozyt
ConA	Concanavalin A
cpm	Zählimpulse pro Minute
CyA	Cyclosporin A
EZ	Effektorzelle
^{3}H-TdR	Tritium(^{3}H)-markiertes Thymidin
Ig	Immunglobulin
LTT	Lymphozytentransformationstest
M-Kat	Methyl-Katechin
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion
NS-Pool	Pool von 4-6 Seren gesunder Spender

PBMC	Periphere Blut mononukleäre Zellen
PHA	Phytohämagglutin
P-Kat	Palmitoyl-Katechin
PWM	Pokeweedmitogen
RZ	Responderzelle
SAC	Staphylokokkus aureus Cowan I
SI	Stimulationsindex
SIF	Seruminhibitionsfaktor
T-Zelle	Thymus-abhängiger Lymphozyt

C. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen über arzneimittelbedingte Überempfindlichkeitsreaktionen

1.1. Untersuchungen bei Patienten mit Catergen((+)-Katechin)-induziertem Fieber

1.1.1. Klinische Befunde

Untersucht wurden 14 Patienten mit akuter, protrahiert verlaufender, chronisch-aktiver oder alkohol-toxischer Hepatitis, die nach Einnahme des Leberschutzpräparats Catergen-((+)-Katechin) Fieber entwickelten.

9 Patienten hatten Fieber bis zu 38.5°C und 5 Patienten bis zu 40°C. Die Fieberreaktion hielt in den meisten Fällen für 2 - 6 Stunden vor und bei 3 Patienten für 1 Tag. Das Fieber trat in 11 Fällen nach Einnahme von 2.5 - 20 g, in 2 Fällen nach 30 - 35 g und bei 1 Patienten nach Einnahme von 150 g (+)-Katechin ein. Die Dauer der Einnahme von Catergen vor Eintritt allergischer Symptome variierte zwischen 1 - 14 Wochen und lag in den meisten Fällen bei 1 - 2 Wochen.

Andere klinische Manifestationen waren Arthralgien (n = 5), Hautausschlag (n = 1) sowie Zeichen einer Cholestase (n = 3), eine erhöhte Glutamattransferase (n = 2) und alkalische Phosphatase (n = 2) Aktivität. In 3 Fällen entwickelte sich eine hämolytische Anämie. Nach Absetzen von (+)-Katechin verschwanden die allergischen Symptome bei allen Patienten. Bei 5 von 8 Patienten, die mit 1 - 2 g (+)-Katechin reexponiert wurden, traten gleiche Überempfindlichkeitsreaktionen wie Fieber und Arthralgien innerhalb von 4 - 10 Stunden auf.

1.1.2. Nachweis (+)-Katechin-induzierter zellulärer Immunreaktion im Lymphozytentransformationstest

Bei 9 von den 14 Patienten ließ sich im Lymphozytentransformationstest in Gegenwart von (+)-Katechin eine signifikant erhöhte dosisabhängige Proliferation der Lymphozyten induzieren, die gegenüber Kontrollen 3 - 5 fach erhöht war.

Abbildung 2 zeigt die Stimulationsraten für die 9 Patienten in Abhängigkeit zu dem Zeitintervall zwischen in vitro-Test und der letzten Verabreichung des Medikaments. Eine erhöhte Proliferationsrate fand sich vor allem während der ersten 4 Wochen nach Absetzen von (+)-Katechin, in 2 Fällen war aber auch noch nach 24 Wochen eine gesteigerte Lymphozytenreaktion feststellbar. Ein Beispiel für die Dosisabhängig-

Abb. 2. Abhängigkeit der Lymphozytenstimulation durch (+)-Katechin von dem Zeitintervall nach letzter Exposition mit diesem Medikament. Angegeben sind die Stimulationsindizes (SI) bei 9 Patienten mit Catergen-((+)-Katechin)-induziertem Fieber.

keit der Stimulation zeigt die Abbildung 3. Maximale Proliferationsraten waren nachweisbar bei einer Konzentration zwischen 5 - 20 µg/ml Wirkstoff bzw. bei Verwendung von "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren, die 90 - 180 Minuten nach Einnahme von (+)-Katechin (1.5 g) gewonnen worden waren.

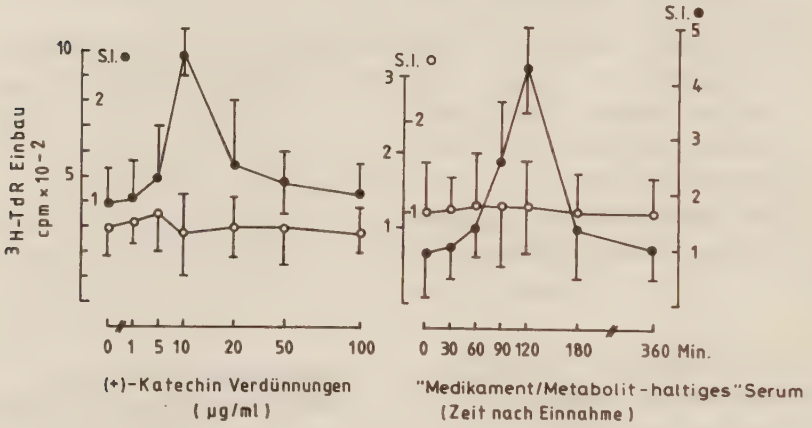


Abb. 3. Abhängigkeit der Lymphozytenproliferation von der (+)-Katechinkonzentration und von dem Zusatz zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnener "Metabolit-haltiger" Seren bei einem Patienten (●-●) und einer Kontrollperson (o-o). Auf der linken Ordinate ist der 3H-TdR-Einbau angegeben. Die korrespondierenden Stimulationsindizes sind für den Patienten auf den äußeren Ordinaten (S.I. ●), für die Kontrollperson auf der mittleren Ordinaten (S.I. o) aufgeführt.

Bei wiederholter Reexposition eines Patienten mit dem Flavonoid kam es jeweils zu einer gleichstarken Fieberreaktion (Abb. 4). Während 7 Wochen nach der 1. Reexposition (13. Woche) noch eine signifikant erhöhte Stimulation durch (+)-Katechin ausgelöst werden konnte, war nach 12 Wochen (18. Woche) keine erhöhte Proliferationsrate mehr nachweisbar. Die Stimulationsindizes ließen sich bei den wiederholten Expositionen nicht über den Ausgangswert steigern.

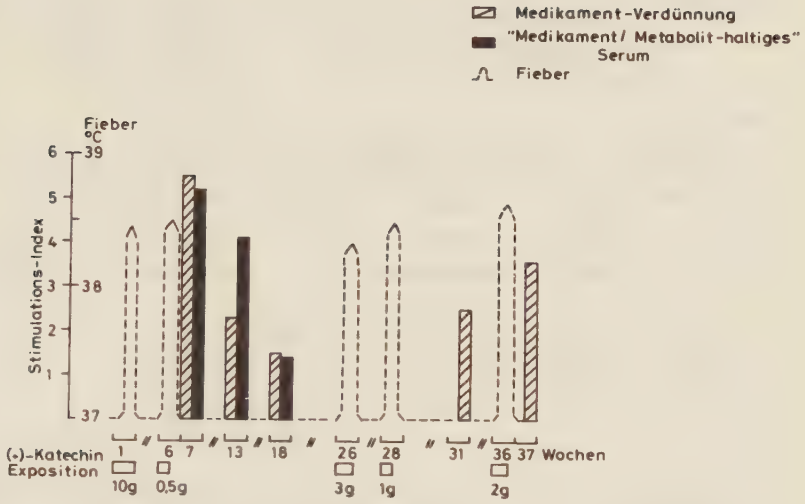


Abb. 4. Lymphozytenstimulationsraten und Fieberreaktionen bei einem Patienten mit Catergen((+)-Katechin)-induziertem Fieber in Abhängigkeit von wiederholten Reexpositionen mit (+)-Katechin.

Eine Übereinstimmung von Überempfindlichkeitsreaktion und in vitro Nachweis sensibilisierter Lymphozyten nach Reexposition war in 6 von 8 Patienten festzustellen, in 4 Fällen bestand eine positive, in 2 Fällen eine negative Korrelation. In den beiden anderen Patienten war entweder nur eine Fieberreaktion oder nur eine positive Lymphozytenreaktion zu beobachten (Tab. 3).

Tabelle 3. Übereinstimmung von Fieberreaktion und in vitro Lymphozytenstimulation nach Reexposition von 8 Patienten mit Verdacht auf Catergen induziertem Fieber.

Anzahl Patienten	Reaktion nach Reexposition mit Catergen	
	Fieber	in vitro Lymphozyten-Stimulation
4	positiv	positiv
2	negativ	negativ
1	positiv	negativ
1	negativ	positiv

1.2. Verlaufsstudie bei einer Patientin mit Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Pyrazolonderivaten

1.2.1. Kasuistik

Untersucht wurde eine Patientin (R.K., geb. 27.12.59), bei der eine Überempfindlichkeit gegenüber Pyrazolon-haltigen Medikamenten bekannt war. Im Alter von 11 Jahren traten erste Manifestationen einer Atopie auf (Abb. 5). Die Patientin bekam Heuschnupfen mit asthmoiden Reaktionen. Im intrakutanen Hauttest (Oktober 1973) waren positive Reaktionen vom Soforttyp gegenüber Graspollen, Roggen und Weizen nachweisbar. Die Patientin wurde daraufhin (1974-1979) mit diesen Antigenen hyposensibilisiert und war danach nahezu beschwerdefrei.

In diesem Zeitraum bestand eine auffällige Infektanfälligkeit der Patientin. Sie nahm zwischen 1972 und 1977 6 - 8 mal Porpyphenazon-haltige (Ilvivo^{R}) sowie Aminophenazon-haltige (Optipect^{R}, Neosal^{R}) Medikamente ein (Tabelle 4).

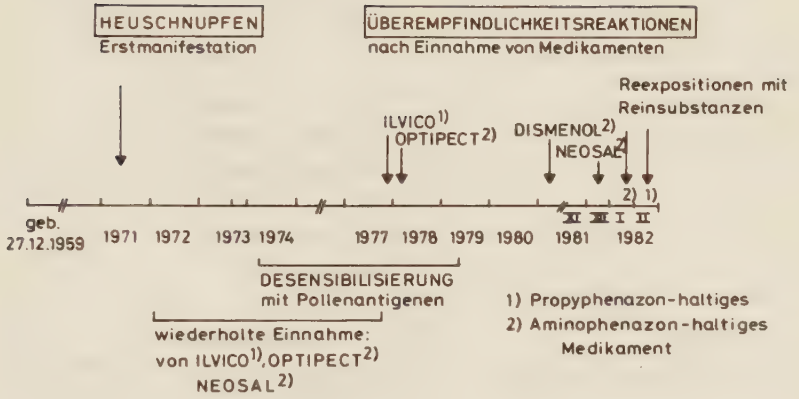


Abb. 5. Kasuistik einer Patientin (R.K.) mit Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Pyrazolon-haltigen Medikamenten.

Die Gesamtdosis von Ilvico^{R} betrug etwa 40 - 60 Dragees. Am Ende der erfolgreichen Desensibilisierung gegenüber Pollenantigenen kam es im Dezember 1977 erstmals zu einer Überempfindlichkeitsreaktion nach Einnahme von 1 Dragee Ilvico^{R}. Ungefähr 1 Stunde nach Einnahme des Medikaments traten generalisierter Juckreiz, Hitzegefühl, Flush sowie urtikarielle Schwellungen auf und hielten für etwa 1 Stunde an. Gleiche Symptome entwickelten sich bei erneuter Einnahme von einem Dragee Ilvico^{R} am folgenden Tag. Zwei Monate später kam es nach Einnahme von Optipect-Tropfen (0.5 g), das Aminophenazon enthält (Tabelle 4), wiederum zu ähnlichen Reaktionen, die allerdings schwächer ausgeprägt waren. Erneute Überempfindlichkeitsreaktionen traten im März 1981 nach Einnahme von Dismenol (1 Dragee) sowie im Dezember 1981 nach Einnahme von Neosaltropfen (1 g) auf. Beide Medikamente enthalten Aminophenazon (Tabelle 4). Dagegen hat die Patientin Phenacetin, Azetylsalicylsäure, Codein- oder Coffein-haltige Arzneimittel, die sie ebenfalls wiederholt seit 1972 eingenommen hatte, gut vertragen.

Tabelle 4. Zusammensetzung der Medikamente, die akute allergische Reaktionen bei der Patientin R.K. auslösten.

1. Ilvico	75 mg Propyphenazon
(1 Dragee)	150 mg Salicylamid
	3 mg Brompheniramin
	20 mg Chinin-HCl
	36 mg Ca-Ascorbat
	10 mg Coffein
2. Optipect	25 mg Aminophenazon
(15 Tropfen ≙ 0.5 g)	5 mg Ephedrin-HCl
	23 mg NH_4Cl
	4 mg Menthol etc.
3. Dismenol	250 mg Aminophenazon
(1 Dragee)	50 mg Parasulfamidobenzoesäure
4. Neosal	225 mg Aminophenazon
(30 Tropfen ≙ 1 g)	113 mg Coffein-Ca-Salicylat
	113 mg Octinum^R-Salicylat

Für eine atopische Veranlagung spricht auch die Familienanamnese. Die Mutter der Patientin, ein Vetter und eine Cousine haben ebenfalls Heuschnupfen (genetische Disposition mütterlicherseits), und bei der Schwester des Vaters ist eine multimedikamentöse Allergie (genetische Disposition väterlicherseits) bekannt (Abb. 6).

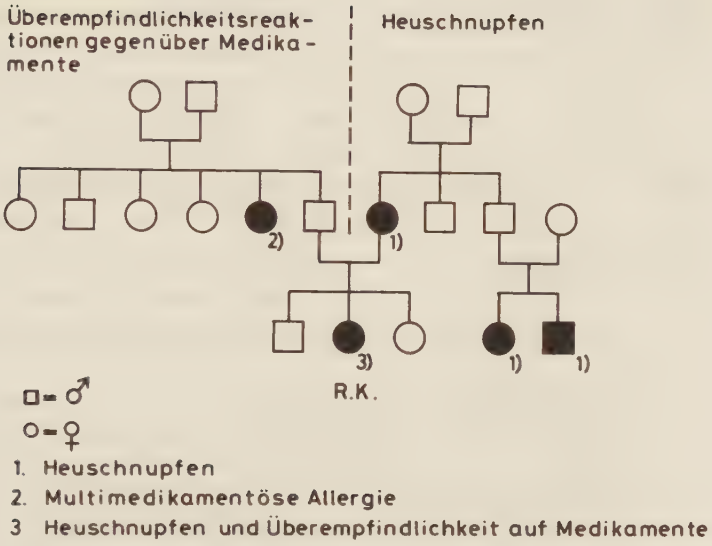


Abb. 6. Genetische Disposition für Heuschnupfen (1) mütterlicherseits (Mutter, Cousine und Vetter) und für medikamentöse Überempfindlichkeitsreaktionen (2) väterlicherseits (Schwester des Vaters) in der Familie der Patientin R.K.

1.2.2. Protokoll der Verlaufsstudie

Um festzustellen, ob es sich um allergische oder pseudoallergische bzw. toxische Reaktionen handelt, wurde mit Einverständnis der Patientin und nach entsprechender Aufklärung eine Reexposition mit beiden in Frage kommenden Substanzen durchgeführt (Abb. 7).

Zu 10 verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Zeitraums von 71 Tagen wurden medikament-spezifische sowie nicht medikament-spezifische in vitro zelluläre Immunreaktionen bestimmt. Zunächst wurden zwei Lymphozytentests durchgeführt (Tag 1 und 7), danach ein Epikutan-Test (Tag 7) und zwei Ta-

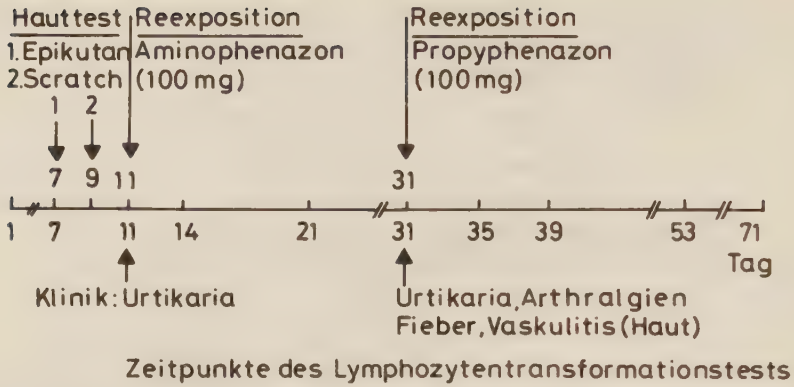


Abb. 7. Untersuchungsprotokoll zum Nachweis einer spezifischen zellulären Immunreaktion bei einer Patientin mit medikamentöser Allergie gegenüber Pyrazolonderivaten. Die Zeitpunkte der Hauttests (n = 2) und Reexpositionen (n = 2) sind oberhalb der Abszisse, die Zeitpunkte der in vitro medikament-abhängigen Lymphozytenstimulationstests sowie der nicht medikament-spezifischen Lymphozytenfunktionstests (n = 10) sind unterhalb der Abszisse angegeben.

ge später ein Scratch-Test (Tag 9), anschließend wurde ein weiterer Lymphozytentest durchgeführt (Tag 11), eine Reexposition mit Aminophenazon (Tag 11), gefolgt von drei weiteren Lymphozytentests (Tag 14, 21 und 31), danach eine Reexposition mit Prophyphenazon (Tag 31) und schließlich 4 weitere Lymphozytentests (Tag 35, 39, 53 und 71). Alle Untersuchungen wurden parallel bei einer gesunden Probandin (B.R., geb. 18.2.57) durchgeführt.

Geprüft wurden a) die Proliferation der Lymphozyten nach Inkubation in Gegenwart von 3 - 7 verschiedenen Konzentrationen der Wirkstoffe und in Gegenwart von 5 - 7 "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren. Als Medikamentwirkstoffe wurden neben Ilvico die Reinsubstanzen Prophyphenazon, Aminophenazon, Brompheniramin, Chinin sowie Phenylbutazon und (+)-Katechin als Kontrollsubstanzen verwendet.

Neben diesen Untersuchungen medikament-spezifischer in vitro Lymphozytenreaktionen wurden b) in vitro zelluläre Immunfunktionen getestet: die Mitogen (PHA) und Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation, die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR), die Mitogen (PWM)-induzierte Immunglobulin G-Synthese und die Mitogen (ConA)-induzierte Aktivität von Suppressorzellen. Zusätzlich wurden zu den einzelnen Zeitpunkten die Seren der Patientin und Normalperson auf immunsuppressive Faktoren (SIF) sowie IgE-Konzentration untersucht.

1.2.3. Hauttests

Die Patientin wurde im Epikutan- sowie Scratch-Test auf Hautreaktionen gegenüber verschiedenen Pyrazolonderivaten und andere Analgetika untersucht[x)], wobei im Scratch-Test eine positiv verwertbare Sofortreaktion gegenüber Prophyphenazon, Dismenol und Metamizol (Aminophenazonderivat) nachweisbar war. Keine Hautreaktionen fanden sich bei Verwendung von Phenylbutazon, Chinin-HCl, Azetylsalicylsäure, Paracetamol, Barbiturate und Phenothiazin aber auch Aminophenazon und Ilvico.

1.2.4. Überempfindlichkeitsreaktionen nach Reexpositionen mit Pyrazolonderivaten

Die Patientin R.K. sowie die Kontrollperson B.R. wurden am 11. Tag der Studie mit je 100 mg Aminophenazon und am 31. Tag mit 100 mg Propyphenazon oral exponiert.

---

x) Die Hauttests wurden in der Universitäts-Hautklinik Tübingen durchgeführt und freundlicherweise von Dr. S.K. Sönnichsen beurteilt.

Fünfzehn Minuten nach der Reexposition mit Aminophenazon verspürte die Patientin ein Kribbeln im Hals. Innerhalb der folgenden 20 Minuten entwickelte sich eine Gesichtsröte und ein Juckreiz. Am linken Unterarm kam es im Bereich der Metamizol (Pyrazolon)-Scratchteststelle zu einer unregelmäßig bogig begrenzten urtikariellen Reaktion (Abb. 8). Die Symptome klangen innerhalb von 45 Minuten ab.

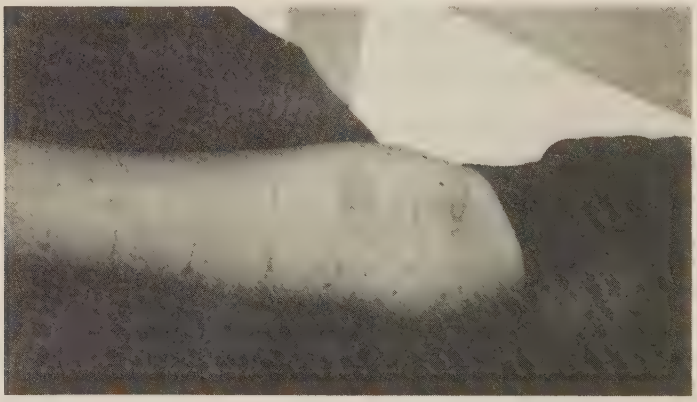


Abb. 8. Nachweis eines Exanthems an der Scratchstelle von Metamizol (Aminophenazonderivat) 2 Tage später nach Reexposition mit Aminophenazon mit einem zeitlichen Intervall von 25 Minuten zwischen der Einnahme und der Hautmanifestation.

Ähnliche, aber wesentlich stärkere Reaktionen traten fünf Minuten nach Reexposition mit Propyphenazon auf. Nach der Reaktion im Mund und Hals kam es zu urtikarieller Lippen-, Augenlider-, Gesichts-, Arm- und Handschwellung innerhalb von 25 Minuten. Schwellungsreaktionen traten auch an den Beinen auf. Nach 2 1/2 Stunden entwickelten sich Kopfschmerzen und nach 6 Stunden Vaskulitis-ähnliche Effloreszenzen an Arm und Bein, die für 3 Tage anhielten. Die Patientin hatte Schüttelfrost und Fieberreaktionen in den drei folgenden Nächten ohne Hinweis auf einen Virus- oder bakteriellen Infekt.

Während der allergischen Symptomatik waren der Puls und der Blutdruck der Patientin normal. Blutproben, die vor und nach den beiden Reexpositionen gewonnen wurden und die auf Blutsenkungsgeschwindigkeit, Blutbild, Enzymwerte, Proteinzusammensetzung (Elektrophorese) untersucht wurden, ergaben keine deutlichen Veränderungen. Insbesondere war keine Eosinophilie feststellbar, allerdings nur in den ersten 2 Tagen nach den Reexpositionen. Im Urin fand sich kein Eiweiß.

Bestimmungen von C_{1q}-bindenden Immunkomplexen im Serum ergaben, daß 2 - 6 Stunden nach Reexposition mit Propyphenazon bei der Patientin gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöhte Immunkomplex-Konzentrationen im Fluoro-immuno-Assay (FIAX) (Faktor = 1.6) nachweisbar waren, die sich jedoch nach einem Tag wieder normalisierten.

Bei der Kontrollperson kam es nach Exposition mit Aminophenazon und Propyphenazon zu keinen allergischen Reaktionen.

1.2.5. Nachweis spezifischer zellulärer Immunreaktionen gegenüber Propyphenazon und Aminophenazon im Lymphozytentransformationstest

In der Verlaufstudie wurden die Lymphozyten der Patientin und Kontrollperson wiederholt in einer 6-Tage-Kultur mit Ilvico und deren Bestandteilen Propyphenazon, Brompheniramin und Chinin inkubiert. Als "Medikament-Antigen" wurden Wirkstoff-Verdünnungen nach Ultraschallbehandlung sowie "Medikament/Metabolit-haltige" Seren verwendet, die von gesunden Probanden nach Einnahme der Substanzen gewonnen worden waren. Da die Patientin keine Überempfindlichkeitsreaktionen auf andere Bestandteile von Ilvico hatte, wurde auf die Austestung dieser Wirkstoffe verzichtet.

Die Abbildungen 9 - 11 zeigen die Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Reaktionen vor den Reexpositionen (Abb. 9), 3 Tage nach Reexposition mit Aminophenazon (Abb. 10) sowie

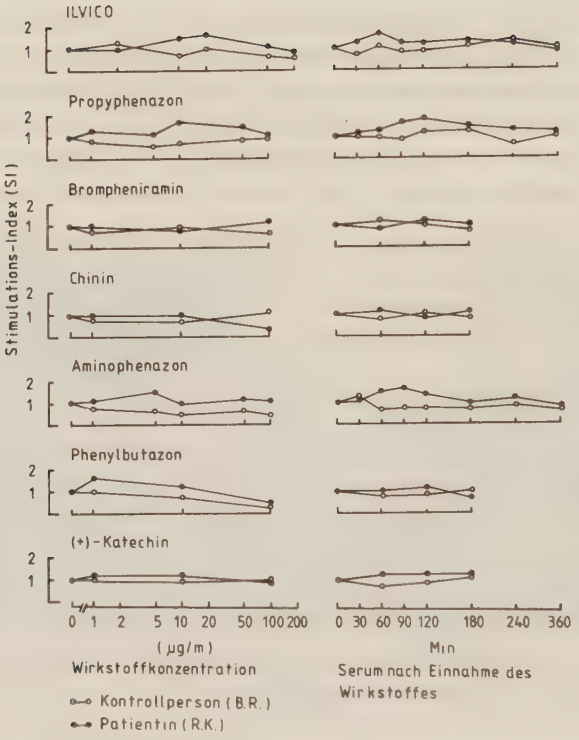


Abb. 9. Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Immunreaktion vor Reexpositionen (Tag 7, siehe Abb. 7) der Patientin mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf Pyrazolonderivate. Lymphozyten aus dem peripheren Blut der Patientin (R.K.) und Kontrollperson (B.R.) wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1-200 µg/ml) eingewogenen Medikaments (Ilvico^{R}) oder von Reinsubstanzen (Propyphenazon bis (+)-Katechin) bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren 6 Tage lang kultiviert. Die Ergebnisse sind als Stimulations-Index angegeben (siehe Methoden).

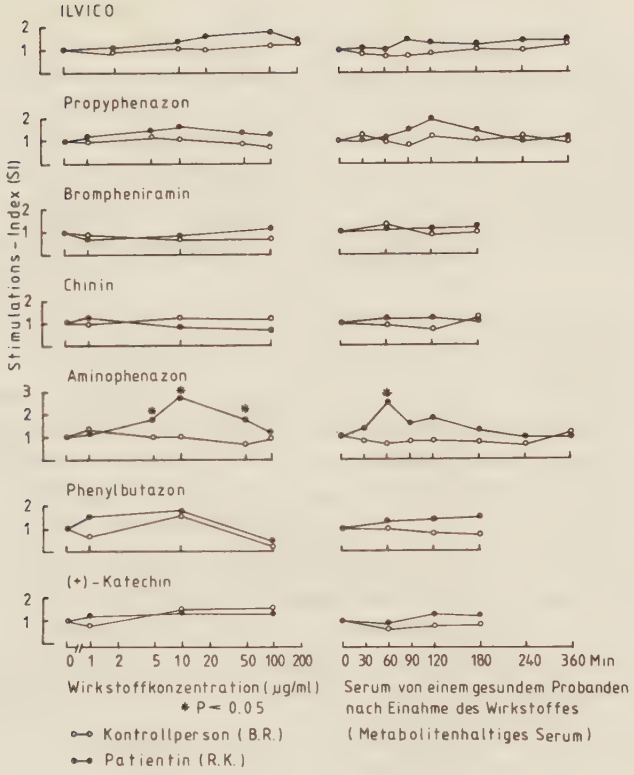


Abb. 10. Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Immunreaktion 3 Tage nach Reexposition mit Aminophenazon (Testtag 14). Signifikant erhöhte Proliferationswerte ($P < 0.05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

4 Tage nach Gabe von Propyphenazon (Abb. 11). Die Konzentrationen der Wirkstoffe variierten zwischen 1 - 200 µg/ml Kulturlösung, die höchsten 3H-TdR Einbauraten fanden sich jedoch in allen Fällen bei Verwendung von 5 - 50 µg/ml. Mit "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren ergaben sich die höchsten zellulären Reaktionen bei Verwendung von Seren, die 60 - 120 Minuten nach Einnahme abgenommen waren.

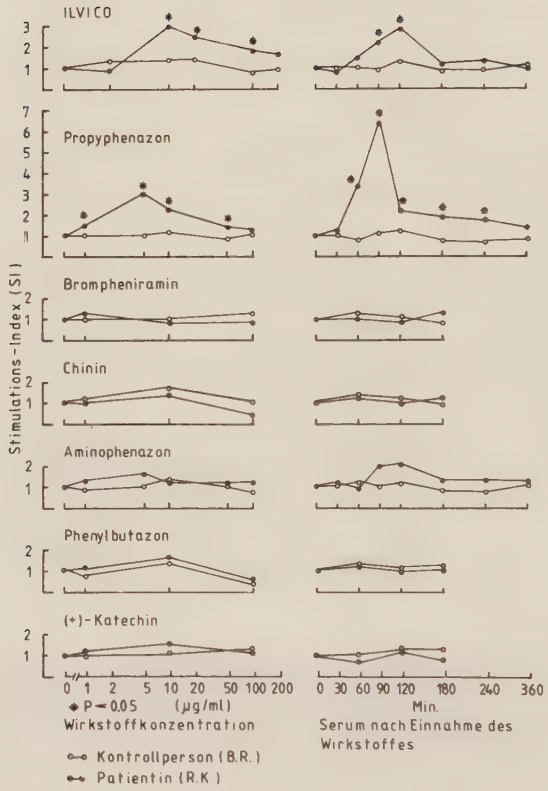


Abb. 11. Konzentrationsabhängigkeit der zellulären Immunreaktion 4 Tage nach Reexposition mit Propyphenazon (Testtag 35). Signifikant erhöhte Proliferationswerte ($P < 0.05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Vor Reexposition fanden sich keine signifikant erhöhten Werte, obwohl die Indizes für die Kulturen der Patientenlymphozyten in Gegenwart von Ilvico, Propyphenazon, Aminophenazon und Phenylbutazon bei nahezu allen Konzentrationen deutlich über denen der Kontrollperson lagen. Signifikante Lymphozytenstimulationsraten waren nach Exposition mit Aminophenazon nur in Gegenwart von Aminophenazon (Abb. 10) und nach Einnahme von Propyphenazon nur bei Zusatz von Propyphenazon bzw. Ilvico auf (Abb. 11).

Auffälligerweise waren 4 Tage nach Reexposition mit Propyphenazon, zum Zeitpunkt der höchsten zellulären Reaktion, die maximalen Proliferationsraten bei Verwendung von niedrigen Wirkstoffkonzentrationen (5 µg/ml) bzw. von 90-Min.-"Medikament/Metabolit-haltigen"-Serum nachweisbar, während bei den nachfolgenden Versuchen die stärksten Reaktionen erst bei höheren Konzentrationen (10 - 50 µg/ml) bzw. mit 120 - 180 Min. "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren erreicht wurden. Ähnliches gilt weniger ausgeprägt für die zellulären Reaktionen gegenüber Aminophenazon und Ilvico.

In der Abbildung 12 werden die maximalen zellulären Reaktionen gegenüber Ilvico^{R} und den darin enthaltenen Wirkstoffen Propyphenazon, Brompheniramin und Chinin im Verlauf der Studie verglichen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Patientenlymphozyten auf den Wirkstoff Propyphenazon nicht aber auf Brompheniramin oder Chinin reagierten. Während die Stimulationsindizes bei der Patientin und der Kontrollperson bei allen Tests, bis auf eine Ausnahme, unter 1.5 lagen, wenn den Kulturen Brompheniramin oder Chinin zugesetzt worden war, fanden sich nur bei Zusatz von Ilvico^{R} oder Propyphenazon und ausschließlich bei der Patientin über den ganzen Beobachtungszeitraum höhere Lymphozytenstimulations-Indizes.

Nach Reexposition mit Aminophenazon kam es zu keiner signifikanten Erhöhung der Stimulationsraten, während die Reexposition mit Propyphenazon eine signifikant gesteigerte Lymphozytenreaktion mit Indizes zwischen 3 - 6.3 bei Zusatz von Ilvico oder Propyphenazon auslöste. 4 Tage nach der Reexpo-

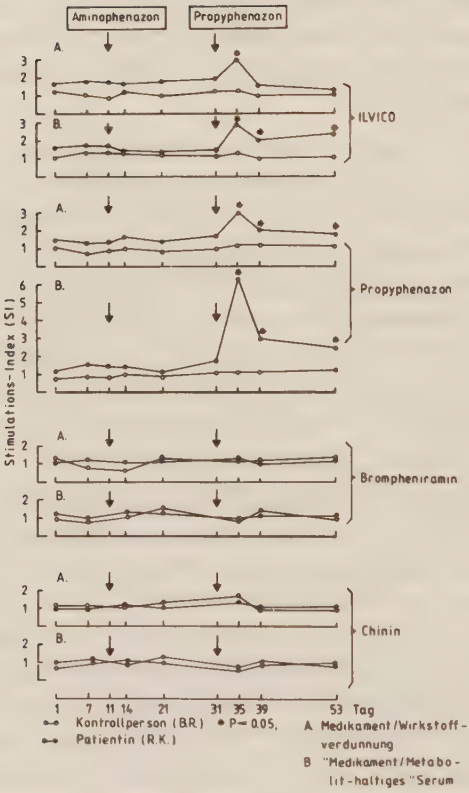


Abb. 12. Nachweis einer spezifischen Immunreaktion gegenüber Propyphenazon bei der Patientin mit Allergie auf Ilvico^{R}. Die Abbildung zeigt die maximalen Lymphozytenproliferationsraten (Stimulations-Indizes) für die Patientin und Kontrollperson in Gegenwart von Medikament/Wirkstoff (A) oder "Medikament/Metabolit-haltigem" Serum (B) von Ilvico^{R} und dessen Bestandteilen Propyphenazon, Brompheniramin und Chinin im Verlauf der Studie (siehe auch Abb. 10).

sition mit Propyphenazon waren die Proliferationsraten am stärksten ausgeprägt. Nach 8 Tagen fiel die Reaktion bereits niedriger aus, konnte jedoch noch 22 Tage nach Einnahme von Propyphenazon nachgewiesen werden (SI 1.8 - 2.5). 40 Tage nach Reexposition (Testtag 71) war die Proliferation nicht mehr signifikant erhöht. Der letzte LTT (Tag 71) wurde nicht mit allen Wirkstoffen durchgeführt und ist daher in den Abbildungen 12, 13, 15 nicht eingezeichnet.

In Abbildung 13 sind die Proliferationsraten der Lymphozyten von der Patientin und Kontrollperson nach Stimulation mit Aminophenazon mit den Werten für Propyphenazon verglichen. Die Strukturformeln sind in Abbildung 14 angegeben. Diese Abbildung zeigt deutlich, daß bei der Patientin spezifische Lymphozytenreaktionen sowohl gegenüber Propyphenazon als auch gegenüber Aminophenazon nachweisbar sind. Die Stimula-

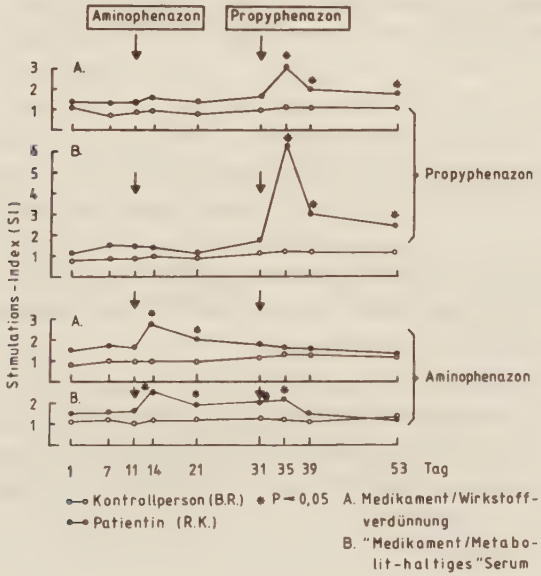


Abb. 13. Nachweis von Propyphenazon und Aminophenazon spezifischer Immunreaktionen bei der Patientin mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf Pyrazolonderivate (siehe auch Abb. 10).

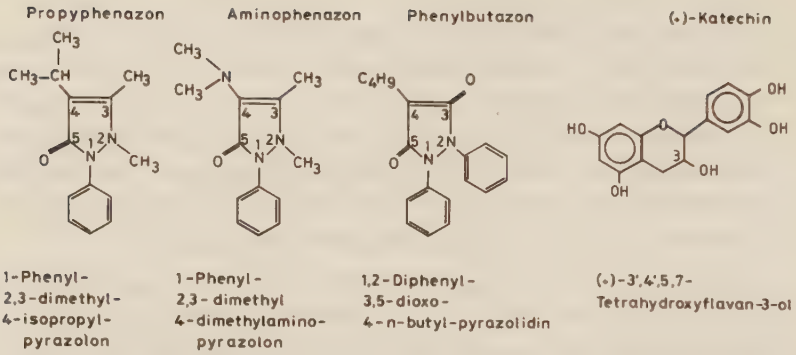


Abb. 14. Strukturformeln von den Pyrazolonderivaten Propyphenazon, Aminophenazon, Phenylbutazon sowie (+)-Katechin.

tionsindizes für beide Wirkstoffe lagen im Ablauf der gesamten Studie bei der Patientin immer höher als bei der Kontrollperson (siehe auch Abb. 9 - 11). Ein SI >1.5 fand sich in 16 von 21 (76 %) Tests bei der Patientin, aber nur in einem Fall (5 %) bei der Kontrollperson. 3 - 24 Tage nach Reexposition mit Aminophenazon fand sich bei der Patientin eine Aminophenazon-spezifische signifikante Erhöhung der Proliferationsraten in der Lymphozytenkultur. Andererseits reagierten die Lymphozyten der Patientin 4 - 22 Tage nach Reexposition mit Propyphenazon stark auf Propyphenazon und geringer auf Aminophenazon.

Keine erhöhten zellulären Reaktionen fanden sich dagegen vor oder nach den Reexpositionen auf Phenylbutazon und (+)-Katechin (Abb. 14), obwohl die Patientenlymphozyten stärker auf Phenylbutazon als auf das Flavonoid (+)-Katechin reagierten (Abb. 15).

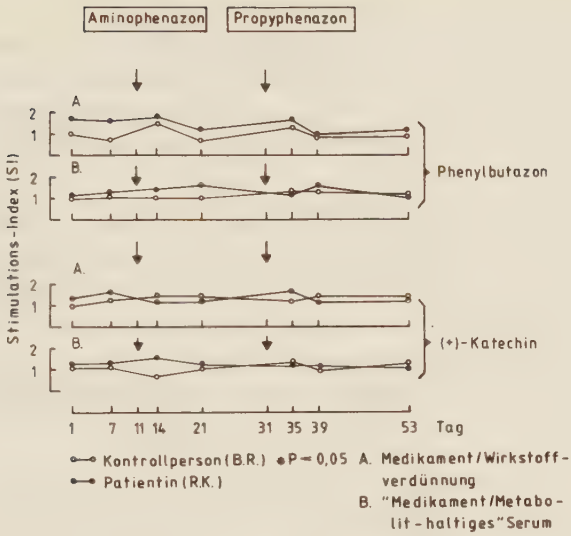


Abb. 15. Fehlen spezifischer Immunreaktionen gegenüber Phenylbutazon und (+)-Katechin im Ablauf der Studie.

1.2.6. Verlaufsbestimmungen nicht medikament-spezifischer zellulärer Immunreaktionen

Neben der Bestimmung der spezifischen zellvermittelten Reaktionen gegenüber den verschiedenen "Medikament-Antigenen" wurden in der Verlaufsstudie auch andere Lymphozytenfunktionen bestimmt (Abb. 16). Während die Mitogen (PHA)-induzierte Proliferation der Lymphozyten bei der Patientin wie der Kontrollperson im Verlauf der Untersuchungen deutlich schwankte, war die Reaktionsfähigkeit gegenüber ubiquitären Antigenen sowie auch die Zweiweg-gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) bei den Versuchen sehr konstant ausgeprägt. Die ConA-induzierte Aktivität von Suppressorzellen war nach Reexposition von Aminophenazon bei der Patientin vorübergehend erhöht nachweisbar.

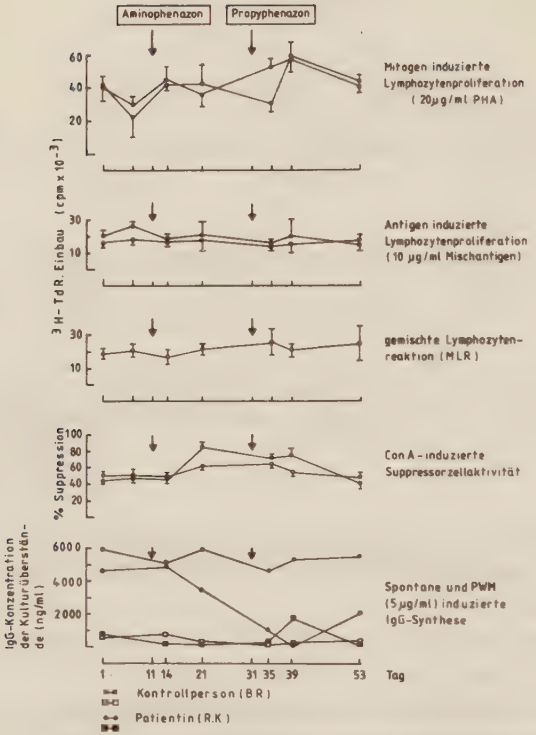


Abb. 16. Verhalten nicht medikament-spezifischer zellulärer Immunreaktionen im Ablauf der Studie. Bei der MLR wurden die PBMC der Patientin und der Kontrollperson gemischt. Die spontane IgG-Synthese ist durch Quadrate (■ Patientin, □ Kontrollperson), die PWM-induzierte IgG durch Kreise (● Patientin, o Kontrollperson) symbolisiert.

Im Gegensatz dazu war die PWM-induzierte Immunglobulin G Synthese der Lymphozyten von der Patientin nach Reexposition mit Aminophenazon geringgradig (25 %), nach Reexposition mit Propyphenazon aber nahezu vollständig (94 %) supprimiert. 8 Tage (Testtag 39) nach der Propyphenazon Reexposition ließ sich durch PWM keine IgG-Produktion induzieren, die spontane IgG-Synthese war jedoch erhöht. Eine geringe IgG-Produktion

war 22 Tage nach der Propyphenazoneinnahme (Tag 53, Abb. 16) wieder nachweisbar. Bei der Normalperson fand sich während des gesamten Beobachtungszeitraums eine relativ konstant hohe IgG-Synthese, die jeweils nur nach den Expositionen mit Aminophenazon oder Propyphenazon (15 - 23 %) geringgradig eingeschränkt war.

Immunsuppressive Serumfaktoren (SIF) waren im Ablauf der Studie weder bei der Patientin noch der Normalperson nachweisbar. Zusätzlich wurden die IgE-Konzentrationen im Serum der Patientin bestimmt, wobei im Ablauf der Untersuchung nur niedrige Werte gemessen wurden (5 - 30 KU/l IgE). Die höchste Konzentration (30 KU/l IgE) fand sich 4 Tage nach Reexposition mit Propyphenazon (Testtag 35).

2. Einfluß von Flavonoiden und anderen pharmakologischen Substanzen auf in vitro Immunreaktionen

Die Untersuchungen über medikamentös-allergische Reaktionen haben gezeigt, daß Arzneimittel wie Pyrazolonderivate oder (+)-Katechin mit dem Immunsystem interagieren und Immunreaktionen induzieren können, die man nach Reexpositionen in vivo und in vitro nachweisen kann. Es sollte nun untersucht werden, inwieweit (+)-Katechin sowie weitere Flavonoide in vitro Immunreaktionen gesunder Individuen beeinflussen. Als Kontrollsubstanzen wurden Cyclosporin A sowie Inosin verwendet, von denen bekannt ist, daß sie immunsuppressiv bzw. stimulierend wirken.

2.1. Lymphozytenproliferation

Lymphozyten von 5 - 15 gesunden Probanden wurden in Gegenwart von Cyclosporin A (CyA) (0.1 - 10 µg/ml), Inosin, Katechin, Methyl-Katechin (M-Kat), Palmitoyl-Katechin (P-Kat)

(1 - 100 µg/ml) sowie Ubichinon (0.5 - 10 µg/ml) 3 - 6 Tage lang ohne Stimulans oder mit Mitogenen (PHA, PWM) oder Antigenen inkubiert. Der 3H-TdR-Einbau dieser Kulturansätze wurde mit Kontrollkulturen ohne Zusatz von Medikament-Wirkstoffen verglichen. Bei CyA, Ubichinon und P-Kat wurden die Kontrollkulturansätze jeweils in einem Milieu durchgeführt, das die gleichen Anteile an Lösungsmitteln enthielt wie die Testansätze mit den höchsten verwendeten Medikamentkonzentrationen.

2.1.1. Spontane Lymphozytenproliferation

Bei 15 gesunden Spendern wurde der Einfluß der Medikamente auf die spontane Proliferation von Lymphozyten untersucht. Eine signifikante Hemmung des 3H-TdR-Einbaus durch Zusatz von CyA war in der 3-Tage-Kultur nachweisbar, jedoch nach 6-tägiger Inkubation wesentlich stärker ausgeprägt. Nach Inkubation der Lymphozyten für 3 Tage führte der Zusatz von 100 ng/ml CyA bei 7 Probanden zu einer 30 - 60 %igen Suppression der Proliferation. Bei höheren CyA-Konzentrationen (0.5 - 10 µg/ml) nahm die Hemmung nicht zu. Nur in 3 - 5 Fällen betrug die Inhibition über 50 %. Nach 6-tägiger Inkubation dagegen war eine Hemmung über 70 % bei Zusatz von 0.5 - 1 µg/ml) CyA in 5 Fällen festzustellen und bei 8 Probanden in Gegenwart von 10 µg/ml CyA.

Im Unterschied zu CyA führte der Zusatz von Inosin zu den Kulturen zu einer erhöhten Proliferationsrate. Eine signifikante Steigerung der 3H-TdR-Einbaurate war nur bei 6-tägiger Inkubation in Gegenwart von 1 - 10 µg/ml Inosin zu beobachten. Zusatz von 50 - 100 µg/ml Inosin führte zu einer Reduktion der stimulierenden Wirkung.

Ähnliche Erhöhungen der 3H-TdR-Einbauraten waren durch die Flavonoide Katechin, M-Kat und weniger deutlich durch P-Kat sowie durch Ubichinon zu erreichen. Signifikante Stimulationen ließen sich durch 10 - 100 µg/ml Katechin erst nach 6-

tätiger Inkubation beobachten, während 10 µg/ml M-Kat und P-Kat bereits nach 3 Tagen Kulturdauer die höchsten 3H-TdR-Einbauraten induzierte. Eine erhöhte Lymphozytenproliferation war auch durch Zusatz von 5 µg/ml Ubichinon in der 6-tägigen Kultur zu induzieren. Konzentrationen über 50 µg/ml dieser Flavonoide führten in fast allen Fällen zu einer Hemmung der Lymphozytentransformation (Abb. 17; Abb. 18).

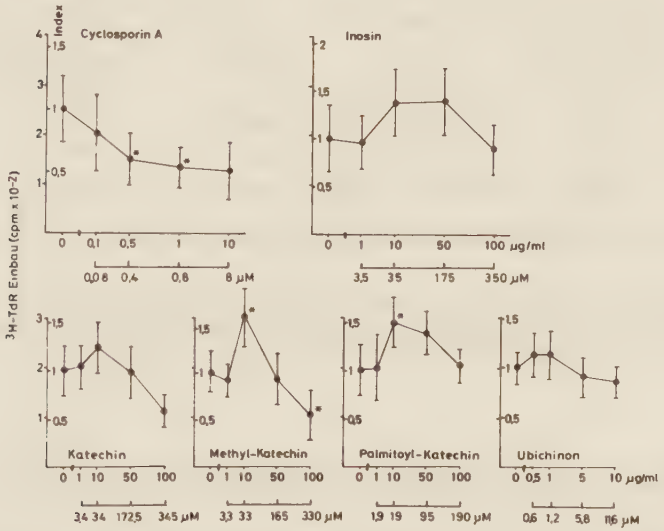


Abb. 17. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die spontane Lymphozytenproliferation nach 3 Tagen bei 15 gesunden Probanden. In der Abbildung sind der 3H-TdR Einbau auf den Ordinaten links und der Reaktionsindex rechts angegeben. Die Konzentrationen sind als µg/ml und µM aufgeführt. Signifikant veränderte Reaktionen ($P < 0.05$) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

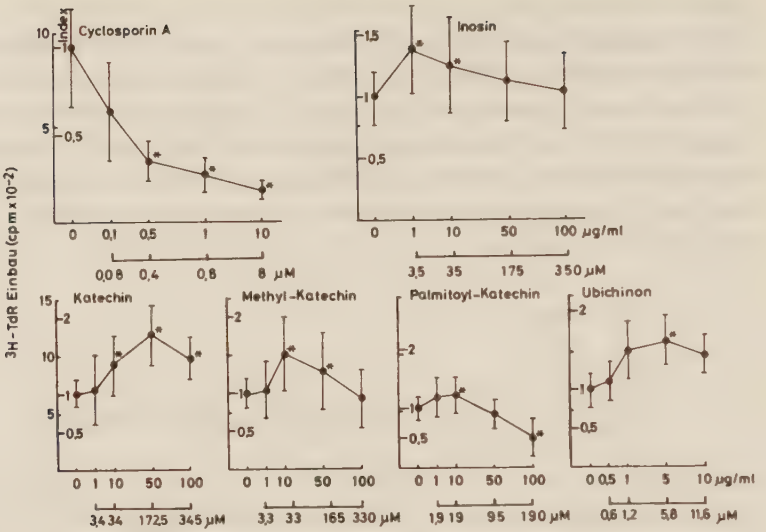


Abb. 18. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die spontane Lymphozytenproliferation nach 6 Tagen bei 10 gesunden Probanden (siehe auch Abb. 17).

2.1.2. Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation

Ein Einfluß auf die Lymphozytenproliferation war auch nach Stimulation der Lymphozyten von 10 gesunden Spendern durch das Mitogen PHA in einer 3-Tage- und bei 5 Spendern durch PWM in einer 6-Tage-Kultur feststellbar (Abb. 19; Abb. 20). Die Effekte waren aber in den meisten Fällen schwächer ausgeprägt. CyA inhibierte die PHA-Antwort bis zu 50 %, während bei der 6-Tage PWM-Stimulation die Hemmung in Gegenwart von 1 µg/ml zwischen 30 - 80 % lag.

Zusatz von mindestens 10 µg/ml Inosin führte in 6 von 10 Personen zu einer 30 - 80 %igen Steigerung der PHA induzierten Lymphozytenprolife ation. Eine erhöhte Proliferation fand sich auch bei 3 er 5 Spender, deren Lymphozyten mit PWM stimuliert wurden (PHA: $\bar{x}$ = 40 ± 30 %; PWM: $\bar{x}$ = 30 ± 20 %

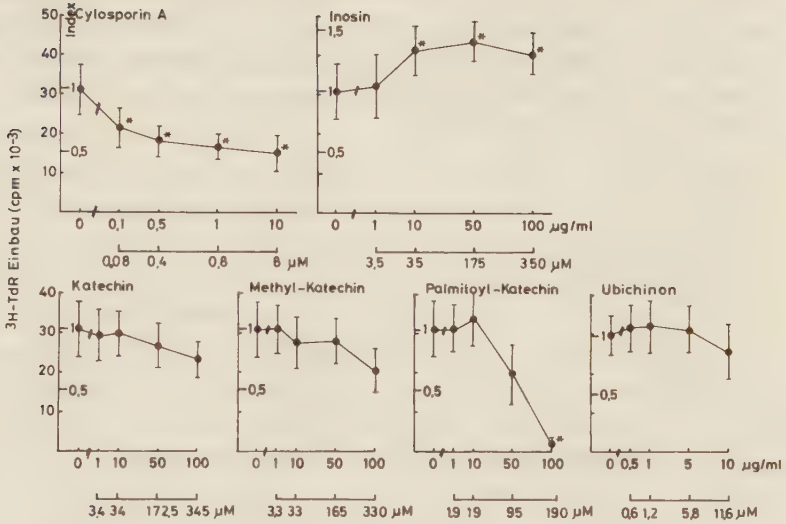


Abb. 19. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die PHA-induzierte Lymphozytentransformation (siehe auch Abb. 17).

Stimulation). Bei höheren Konzentrationen war der stimulierende Effekt durch Inosin in 8 (PHA) bzw. 4 (PWM) Spendern nachweisbar.

Keine signifikante Stimulation konnte bei Zusatz von Flavonoidderivaten und Ubichinon nach PHA-Stimulation beobachtet werden. Zu erhöhten Proliferationsraten kam es in 1 - 2 Fällen in Gegenwart von 1 - 10 µg/ml Katechin (30 %), 1 - 50 µg/ml M-Kat (30 - 40 %), 1 - 10 µg/ml P-Kat (30 - 70 %) sowie 0.5 - 5 µg/ml Ubichinon (30 - 70 %). Zusatz von 100 µg/ml Wirkstoff führte im Fall von Katechin bei 7 Personen zu einer 30 - 40 %igen Inhibition, bei M-Kat bei 8 Personen (30 - 60 %), bei Ubichinon (10 µg/ml) in einem Fall (40 %), jedoch in Gegenwart von P-Kat in allen 10 Testpersonen (80 - 90 %).

Die PWM-induzierte Lymphozytenproliferation ließ sich durch Zugabe von Katechin und M-Kat nur in einem Falle erhöhen

(40 - 100 %). Kein Effekt war durch Ubichinon zu erreichen. Dagegen reagierten 3 der 5 Personen in Gegenwart von 50 µg/ml P-Kat mit einer 60 - 80 %igen Proliferationssteigerung. Zusatz von 100 µg/ml P-Kat führte erneut zu einer über 90 %-igen Proliferationshemmung.

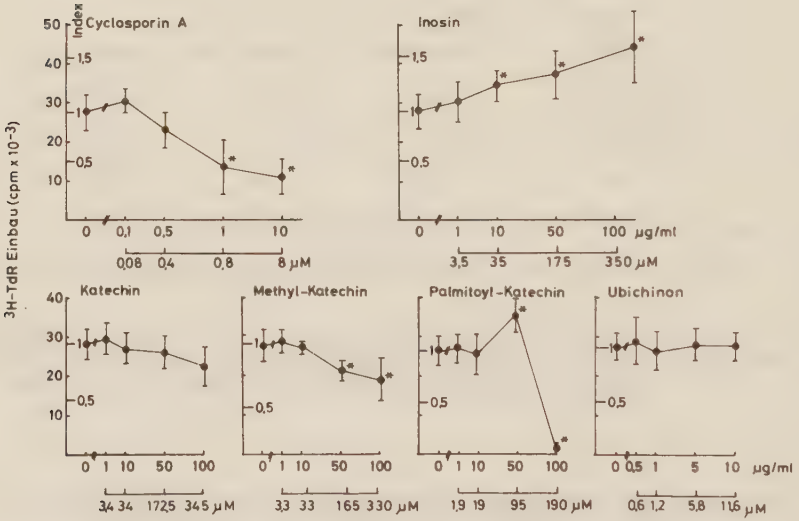


Abb. 20. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die PWM-induzierte Lymphozytentransformation bei 5 gesunden Spendern (siehe auch Abb. 17).

2.1.3. Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation und gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Ähnliche Ergebnisse fanden sich nach Stimulation der Lymphozyten von 10 gesunden Spendern durch ubiquitäre Antigene (MAg) sowie durch Alloantigene in der MLR (Abb. 21; Abb. 22).

In Gegenwart von 0.1 µg/ml CyA fand sich bei 7 von 10 Personen, deren Lymphozyten durch MAg stimuliert worden waren,

eine 30 - 60 %ige Inhibition ebenso bei 4 von 6 MLR-Kombinationen (30 - 50 %). Bei höheren Konzentrationen war in allen Fällen eine starke Suppression nachweisbar (Antigenreaktion: 60 - 90 % bei 1 µg/ml CyA; 50 - 90 % bei 10 µg/ml CyA in der MLR).

Zusatz von Inosin führte bei 6 - 7 Personen zu einer erhöhten Antigenantwort, die bei 10 - 50 µg/ml 30 - 90 %, bei 100 µg/ml 40 - 100 % betrug ($\bar{x}$ = 50 ± 30 % Stimulation). Die MLR wurde nur in 1 - 2 Kombinationen allogener Zellen um 40 - 60 % verstärkt.

Keine signifikante Stimulation fand sich in Gegenwart von Katechinderivaten und Ubichinon. Die Antigen-induzierte Lymphozytenproliferation war durch Zusatz von Katechin und M-Kat nur in 1 - 3 Fällen 30 - 60 % erhöht, in Gegenwart von Ubi-

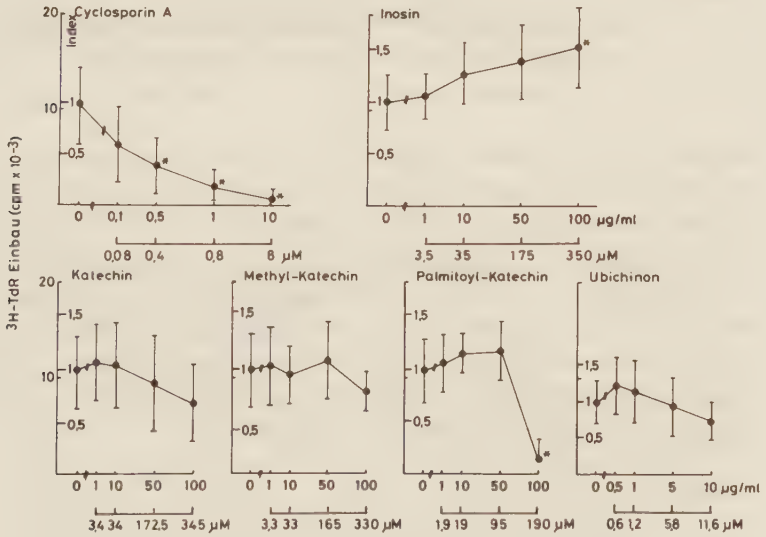


Abb. 21. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die Antigen (ubiquitäre Antigene, siehe Methoden) -induzierte Lymphozytenproliferation bei 10 gesunden Spendern (siehe auch Abb. 17).

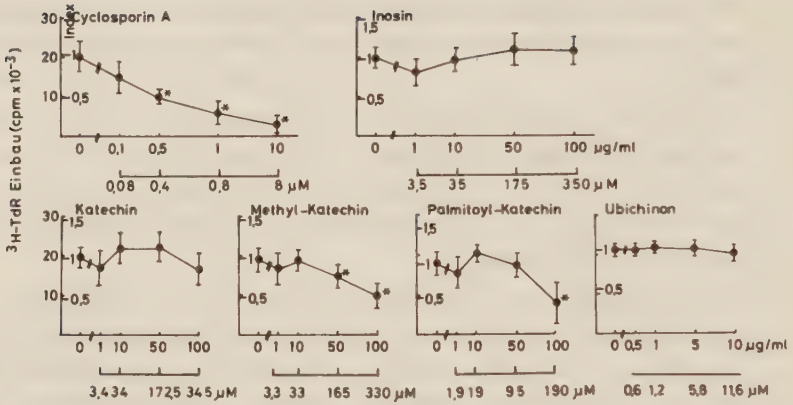


Abb. 22. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die Zwei-Weg-gemischte Lymphozytenreaktion (MLR). Untersucht wurden 5 verschiedene Kombinationen nicht verwandter Spender (siehe auch Abb. 17).

chinon (0.5 - 1 µg/ml) war bei 3 - 5 Personen eine 30 - 90 %-ige Stimulation nachweisbar. Ähnlich wie beim PWM führte der Zusatz von 50 µg/ml P-Kat in 3 Fällen zu einer 70 - 90 %igen Erhöhung der Transformation, 100 µg/ml dagegen inhibierte die Reaktion 70 - 99 %. Die MLR wurde durch die Flavonoid-derivate nur in Einzelfällen verstärkt. Eine Hemmung fand sich in Gegenwart von 50 - 100 µg/ml M-Kat in 2 bzw. 6 von 7 Lymphozytenkombinationen (40 - 70 %) sowie von 100 µg/ml P-Kat in 5 Fällen und betrug 30 - 100 %.

2.2. Immunglobulinsynthese

Bei 3 gesunden Probanden wurde der Einfluß von Katechin, M-Kat, P-Kat, Ubichinon, Inosin sowie CyA auf die Immunglobulinsynthese in vitro untersucht. PBMC (0.5 x 10^6/0.5 ml) wurden in Gegenwart von 0.04 - 25 µg/ml der verschiedenen pharmakologischen Substanzen ohne Stimulans (spontane Ig-Synthese) oder mit PWM (10 µg/ml) (PWM-induzierte Ig-Synthese) sowie mit Staphylokokkus aureus Cowan I (SAC, 200 x 10^6/ml) (SAC-induzierte Ig-Synthese) 7 Tage lang inkubiert und die IgG- sowie IgM-Produktion in den Kulturüberständen im Fluoroimmuno-Assay gemessen (Abb. 23 - 25).

2.2.1. Spontane Immunglobulinsynthese

Katechin, vor allem aber M-Kat, erhöhten signifikant die spontane IgG-Synthese. Bei Zusatz von 5 µg/ml kam es zu einer 50 %igen Steigerung der IgG-Konzentration im Kulturüber-

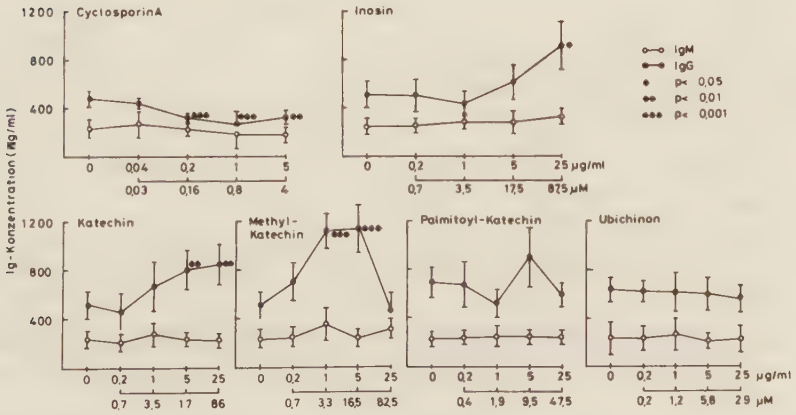


Abb. 23. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die spontane Ig-Synthese bei 3 gesunden Probanden.

ständen (Abb. 23). Ähnlich, aber stärker ausgeprägt, war die Erhöhung der IgG-Synthese in Gegenwart von M-Kat (120 %; P <0.001). Inosin (25 µg/ml) steigerte die spontane IgG-Produktion um 80 %, CyA dagegen inhibierte die Reaktion 30 - 40 %. Ubichinon und P-Kat lösten keinen signifikanten Effekt auf die IgG-Synthese aus. Die geringe spontane Produktion von IgM wurde durch die pharmakologischen Substanzen nicht beeinflußt.

2.2.2. Pokeweedmitogen-induzierte Immunglobulinsynthese

Ähnliche Effekte ließen sich auch nach Stimulation der Lymphozyten mit PWM nachweisen (Abb. 24), wobei in den Überständen der Kontrollkulturen etwa 2000 ng/ml IgG und 1200 ng/ml IgM gemessen wurde. In Gegenwart von 0.2 - 25 µg/ml Katechin, M-Kat und Inosin kam es zu signifikanten Steigerungen der

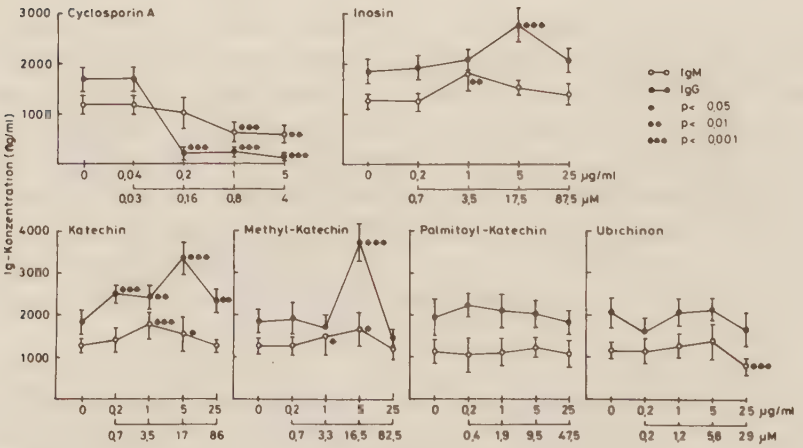


Abb. 24. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die PWM-induzierte Ig-Synthese bei 3 gesunden Probanden.

Ig-Konzentrationen. Maximale Effekte auf die IgG-Sekretion fanden sich bei 5 µg/ml (Katechin: 80 % P <0.001 ; M-Kat: 100 % P <0.001; Inosin: 50 % P <0.001). Die stärkste Steigerung der IgM-Synthese fand sich bei 1 µg/ml (Katechin: 40 % P <0.01; M-Kat: 30 % P <0.05; Inosin: 50 % P <0.01). CyA (0.2 - 5 µg/ml) inhibierte vor allem die IgG-Produktion bis zu 86 % (P <0.001). P-Kat und Ubichinon hatten wiederum keinen Einfluß auf die PWM-induzierte Ig-Synthese.

2.2.3. Staphylokokkus aureus Cowan I (SAC)-induzierte Immunglobulinsynthese

Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen hatte CyA und Inosin keinen Effekt auf die Ig-Synthese nach Stimulation mit SAC (Abb. 25). Katechin und M-Kat führten dagegen wiederum zu einer Steigerung der IgM-Produktion bei einer Konzentration von 1 µg/ml (Katechin: 70 % P <0.01; M-Kat: 50 %

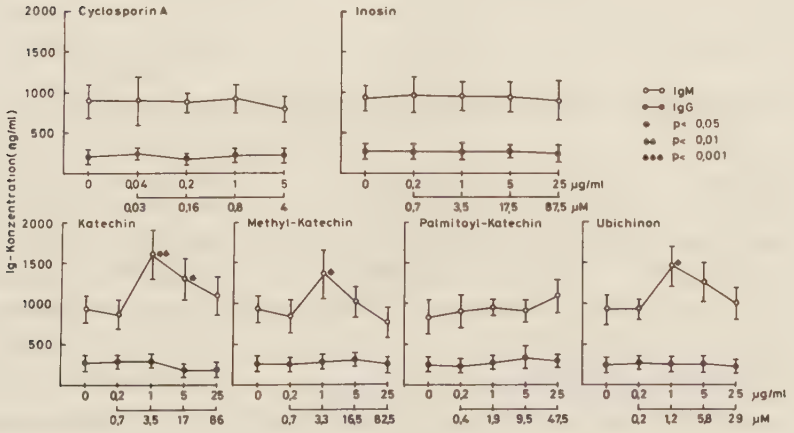


Abb. 25. Einfluß von pharmakologischen Substanzen auf die Staphylokokkus aureus Cowan I-induzierte Ig-Synthese bei 3 gesunden Probanden.

P <0.05). Eine signifikante Steigerung der IgM-Sekretion fand sich auch bei Zusatz von 1 µg/ml Ubichinon (60 % P <0.05), während P-Kat keinen Einfluß auf diese Reaktion hatte. Nach SAC-Stimulation fand sich nur eine sehr geringe IgG-Synthese in den Kulturüberständen.

In den Tabellen 5 und 6 sind die wesentlichen Ergebnisse aufgeführt, die mit optimalen Konzentrationen der Wirkstoffe gewonnen wurden. Während die Flavonoide Katechin und M-Kat die spontane, PWM- und SAC-induzierte Ig-Synthese erhöhten, wirkten CyA und Inosin nur auf die spontane und PWM-induzierte Ig-Produktion.

Tabelle 5. Einfluß der optimalen Wirkstoffkonzentration auf die spontane und PWM-induzierte Immunglobulin G-Synthese

Wirkstoffzusatz (5 µg/ml)	Spontan		PWM	
	IgG (ng/ml)	SI[1)]	IgG (ng/ml)	SI
0	527 ± 126		1867 ± 288	
Katechin	800 ± 268 (P <0.01)	1.5	3387 ± 482 (P <0.001)	1.8
M-Katechin	1173 ± 412 (P <0.001)	2.2	3760 ± 763 (P <0.001)	2.0
Inosin	920 ± 510[2)] (P <0.05)	1.8	2747 ± 531 (P <0.001)	1.5
CyA	270 ± 116[3)] (P <0.001)	0.6	293 ± 97 (P <0.001)	0.2

1) Stimulationsindex
2) Wirkstoffkonzentration: 25 µg/ml
3) Wirkstoffkonzentration: 1 µg/ml

Tabelle 6. Vergleich des Einflusses optimaler Wirkstoffkonzentration auf die PWM- und Staphylokokkus aureus Cowan I (SAC)-induzierte Immunglobulin M-Synthese

Wirkstoffzusatz (1 µg/ml)	PWM		SAC	
	IgM (ng/ml)	SI[1)]	IgM (ng/ml)	SI
0	1280 ± 197		933 ± 196	
Katechin	1787 ± 260 (P <0.001)	1.4	1600 ± 491 (P <0.01)	1.7
M-Katechin	1533 ± 224 (P <0.05)	1.2	1360 ± 484 (P <0.05)	1.5
Inosin	1853 ± 460 (P <0.01	1.5	947 ± 291	1.0
CyA	680 ± 237 (P <0.01)	0.5	955 ± 196	1.0

1) Stimulationsindex

2.3. Einfluß von (+)-Katechin auf ConA-induzierte Aktivität von Suppressorzellen

Bei 5 gesunden Spendern wurde der Effekt von (+)-Katechin auf die Induktion der Suppressorzellen-Aktivität durch ConA bestimmt (Tab. 7). Kein Effekt war nachweisbar, wenn der Vorkultur 10 µg/ml (+)-Katechin zugesetzt wurde, während eine 10 % erniedrigte Aktivität in Gegenwart von 100 µg/ml festzustellen war.

Insgesamt ist der Effekt der Medikamente auf die spontane und Mitogen oder Antigen induzierte Lymphozytenproliferationen einheitlich ausgeprägt. CyA hemmte die 3H-TdR-Einbauraten, wobei der Effekt auf die PHA-Antwort am schwächsten aus-

Tabelle 7. Einfluß von (+)-Katechin auf ConA-induzierte Aktivität von Suppressorzellen bei 5 gesunden Spendern

	ConA-Konzentration (µg/ml) in der Vorkultur[1]	
	0	60
Kontrolle	cpm 13649 ± 3906[2]	% Suppression 60 ± 10 %[3]
Zusatz von (+)-Katechin in der Vorkultur		
10 µg/ml	15556 ± 3673	61 ± 7 %
100 µg/ml	15690 ± 2039	55 ± 8 %

1) 6 x 10^6 PBMC/2 ml wurden 48 Stunden lang in Gegenwart von 0 und 60 µg/ml ConA vorinkubiert und der Einfluß dieser Effektzellen (EZ) auf die Proliferation ConA-stimulierter Respondzellen (RZ) in einer Kokultur bestimmt.

2) 3H-TdR-Einbau der Kokulturen von ConA (5 µg/ml) stimulierte RZ mit nicht voraktivierten EZ ($RZ \times EZ_{RPMI}$).

3) Suppression (%) des 3H-TdR-Einbaus der stimulierten RZ durch ConA (60 µg/ml) voraktivierte EZ ($RZ \times EZ_{ConA}$).

geprägt war, Inosin andererseits erhöhte bei allen untersuchten Reaktionen, bis auf die MLR, signifikant bis zu einer mittleren Stimulationsrate von 50 ± 30 %. Eine signifikant erhöhte Transformationsrate fand sich bei Zusatz von Katechinderivaten (10 - 50 µg/ml) und Ubichinon nur nach 6-tägiger Inkubation ohne Stimulans. In höheren Konzentrationen (100 µg/ml) führte der Zusatz von M-Kat in vielen Fällen, bei P-Kat in allen Fällen zu einer signifikanten Inhibition. Wesentlich deutlicher waren die stimulierenden Effekte der Flavonoide Katechin, M-Kat auf die in vitro Immunglobulinsynthese, die z.T. höher ausfielen als die Werte für Inosin. P-Kat und Ubichinon führten jedoch nur punktuell zu einer Erhöhung der Ig-Konzentrationen. Auffällig war, daß

die Flavonoide nicht nur die spontane, sondern auch die PWM- und Staphylokokkus aureus Cowan I-induzierte Ig-Synthese verstärkten, während CyA und Inosin keinen Einfluß auf die Staphylokokken-stimulierte IgM-Produktion hatten.

D. DISKUSSION

Eine Unterscheidung zwischen allergischen und toxischen Nebenwirkungen eines Medikaments ist häufig schwierig (Parker, 1980). Das entscheidende Kriterium für eine allergische Reaktion ist der Nachweis von "Medikmaent-Antigen" spezifischen Immunreaktionen, d.h. entweder von sensibilisierten Lymphozyten oder spezifischen (anti Hapten) Antikörpern. Die Aussagekraft von Hauttests ist beschränkt und Reexpositionsversuche sind in vielen Fällen zu risikoreich (Namihisa et al., 1974; Rubb, 1969; Shulman, 1972). Mit dem LTT steht heute eine Methode zur Verfügung, die risikolos den Nachweis medikament-spezifisch sensibilisierter Lymphozyten im peripheren Blut ermöglicht. Bisher wurde der LTT mit Zurückhaltung beurteilt. Die unterschiedlichen Ergebnisse aus verschiedenen Arbeitsgruppen lassen sich zum großen Teil mit unzureichend standardisierten und optimierten Testverfahren erklären (Amos, 1980; Davies + Holmes, 1972; Davis + Ezeoke, 1973; Pearsall et al., 1974; Sarkany, 1967; Sheffer et al., 1975).

Die Schwierigkeit bestand darin, eine meßbare Transformation von Lymphozyten aus dem peripheren Blut nachzuweisen, da die immunkompetenten Zellen wahrscheinlich nur zu einem kleinen Teil zirkulieren (Parker, 1980). Problematisch ist vor allem, die Lymphozyten mit dem die in vivo Reaktion auslösenden "Medikament-Antigen" in Kontakt zu bringen. Bei den Medikamenten handelt es sich um Haptene, die nur nach Bindung an einen Träger (Makromolekül) immunogen sind (Levine, 1966; Schneider + Deweck, 1967). Die Arzneimittel werden im Plasma zu einem unterschiedlichen Anteil an Serumproteine, hauptsächlich Albumin, nicht kovalent gebunden (DeSwarte, 1980; Parker, 1980).

Aus diesem Grund wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die Präparation der Medikament-Verdünnungen in einem Milieu durchgeführt, das 50 % Normalserum enthält. Die Wirkstoffe

können sich aber auch Membranen z.B. der Lymphozyten oder an Mikrosomen direkt binden (DeSwarte, 1980; Parker, 1975a; Parker, 1980). Eigene Versuche, in denen den Kulturen verschiedene Konzentrationen von Rattenleber-Mikrosomen zugesetzt wurden, führten allerdings bisher nicht zu einer Steigerung der Immunreaktion, sodaß die Untersuchungen ohne Mikrosomenzusatz durchgeführt wurden. Als weitere "Medikament-Antigen-Quelle" wurden zusätzlich Seren gesunder Probanden verwendet, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Einnahme der Substanzen gewonnen worden waren ("Medikament/Metabolit-haltige" Seren).

Bei der Studie über den Nachweis einer Medikament-induzierten Allergie gegenüber Pyrazolonderivaten wurden verschiedene in Frage kommende Wirkstoffe, deren Kombination sowie nicht verwandte Substanzen als Kontrolle ausgetestet, wobei Konzentrationen und Präparation (Reinsubstanz oder Metaboliten-haltige Seren) variiert wurden. Dadurch erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit, die die Immunreaktion induzierende Substanz bzw. den entsprechenden Metaboliten mit den immunkompetenten Lymphozyten in Kontakt zu bringen. Gleichzeitig konnte die Spezifität der Reaktion geprüft werden. Schließlich konnte durch die Verlaufsbestimmungen die Zeitabhängigkeit des in vitro Nachweis von sensibilisierten Lymphozyten nach Auftreten der allergischen Reaktionen ermittelt werden.

Eine Optimierung der Zellkulturtechnik wurde dadurch erreicht, daß das verwendete Kulturmedium zusätzlich Proteine und einen Sojabohnenextrakt (Iscove's Medium) enthielt und dadurch günstige Milieu-Bedingungen für die Lymphozytentransformation in der 6-Tage-Kultur gegeben waren. Es wurden höhere Konzentrationen von Lymphozyten als bei der Stimulation durch Mitogene und ubiquitäre Antigene und eine längere Inkubationszeit für Markierung mit 3H-Thymidin gewählt. Eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse konnte dadurch erreicht werden, daß alle Versuche parallel bei der Patientin sowie einer vergleichbaren Normalperson durchgeführt wurden und gleiche Versuchsbedingungen waren dadurch gewährleistet, daß alle Versuchsplatten mit den verschiedenen Verdünnungen

und Metaboliten-Reagenzien vor Beginn der Studie zu einem Zeitpunkt vorbereitet worden waren, so daß an den Testtagen nur noch die Lymphozyten der Patientin und Normalperson isoliert und zugesetzt wurden. Unterschiede der Immunkompetenz aufgrund von zirkadianen Biorhythmen wurden dadurch ausgeschaltet, daß das Blut jeweils zum gleichen Zeitpunkt abgenommen wurde (Pownall + Knapp, 1980).

Unter diesen standardisierten Kulturbedingungen konnte gezeigt werden, daß bei der Patientin bereits vor Reexposition eine erhöhte Lymphozytentransformationsrate gegenüber Propyphenazon und Aminophenazon nicht jedoch gegenüber Brompheniramin, Chinin oder (+)-Katechin nachweisbar war. Es ist anzunehmen, daß Pyrazolon-spezifische Gedächtniszellen im Blut der Patientin zirkulieren. Nach Reexposition mit Aminophenazon wurde spezifisch und signifikant die Proliferation durch Aminophenazon erhöht. Ähnlich, jedoch in einem stärkeren Ausmaß, war nach Reexposition mit Propyphenazon eine Immunantwort nur gegenüber Propyphenazon gesteigert.

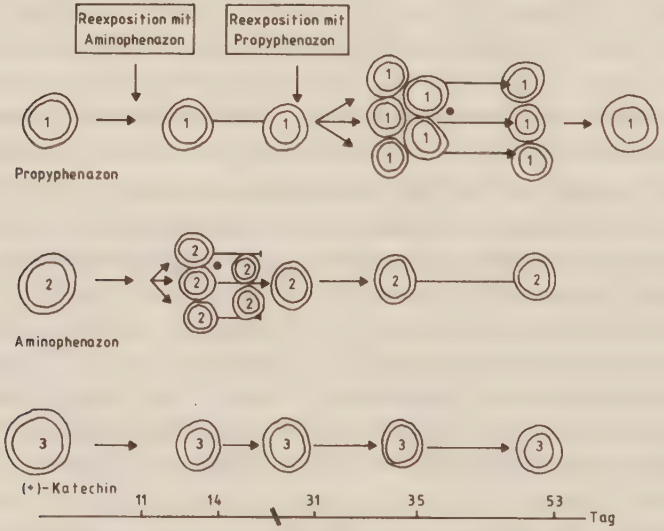


Abb. 26. Schematische Darstellung von medikament-spezifischen Lymphozytenklonen (1-3) und deren Proliferation (⊠) nach spezifischer Reexposition mit Pyrazolonderivaten.

In Abbildung 26 werden schematisch verschiedene Medikament-spezifische Lymphozytenklone dargestellt, die jeweils nur nach Reexposition mit dem korrespondierenden Medikament mit unterschiedlicher Intensität aktiviert werden.

Die Spezifität der zellulären Immunantwort gegenüber Aminophenazon bzw. Propyphenazon, zwei nahezu identische Pyrazolonderivate, bei denen lediglich eine Dimethylaminogruppe durch eine Isopropylgruppe ausgetauscht ist, wird vor allem dadurch verständlich, da sich die Abbauwege beider Wirkstoffe wesentlich unterscheiden und sehr verschiedene Metaboliten gebildet werden. Beim Propyphenazon wird zunächst die N-2-Methylgruppe abgespalten, die C-5-Ketogruppe glucuronisiert oder C-4-Isopropylgruppe oxidiert (Abb. 27) (Volz + Kellner, 1980). Beim Aminophenazon dagegen wird insbesondere die C-4-Di-Methyl-Aminogruppe demethyliert oder formyliert (Breyer-Pfaff et al., 1982; Volz + Kellner, 1980) (Abb. 28).

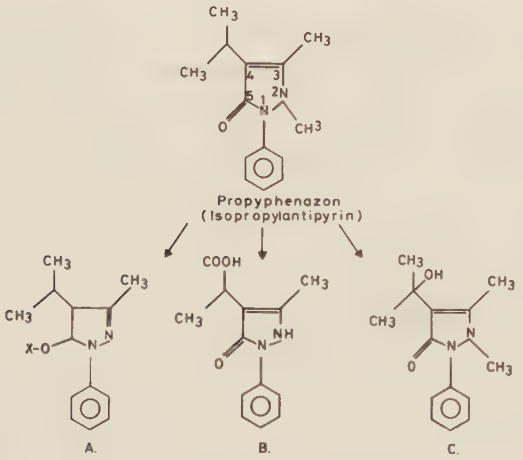


Abb. 27. Struktur von Propyphenazon und deren wichtigsten Metaboliten. Metabolit A kann mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure (X) konjugiert sein (nach Volz + Kellner, 1980).

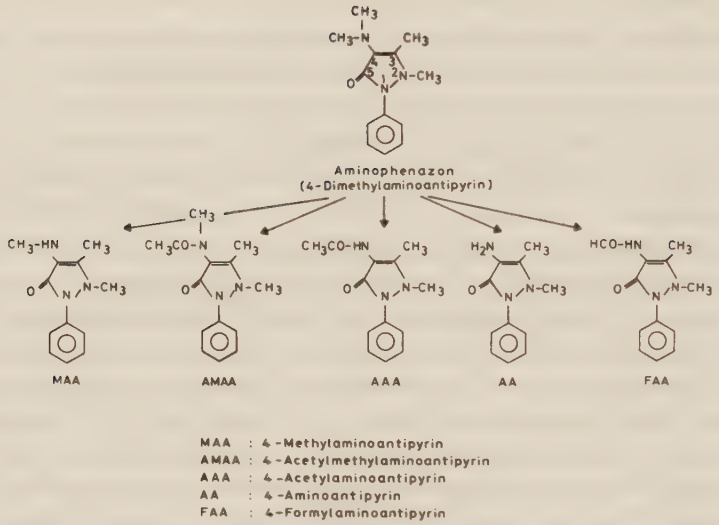


Abb. 28. Struktur von Aminophenazon und deren wichtigsten Metaboliten (nach Volz + Kellner, 1980).

Die spezifische Reaktion war in den meisten Fällen bei Verwendung von "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren als "Medikament-Antigen" stärker ausgeprägt als bei der Verwendung der Reinsubstanz. Dieser Befund, der auch bei anderen Untersuchungen medikamentöser Allergien beobachtet werden konnte (Namihisa et al., 1975), spricht dafür, daß bei der Sensibilisierung vor allem Metabolite der Medikamente beteiligt sind oder das Medikament in diesen Seren in einer geeigneten Form den kompetenten Immunzellen präsentiert wird. Die höchsten Stimulationsindizes fanden sich für Aminophenazon, wenn "Medikament/Metabolit-haltige" Seren zu den Kulturen gegeben wurden, das 60 Min. nach Einnahme des Wirkstoffs abgenommen worden war, d.h. in Gegenwart von Seren, die nach Breyer-Pfaff (1982) die höchsten Konzentrationen von Aminophenazon sowie dem Haupt-Metabolíten 4-Methylaminoantipyrin (MAA) enthalten. Die Pharmakokinetik von Aminophenazon und dessen Metaboliten ist in Abb. 29 dargestellt. 1/2 - 1 Stunden nach

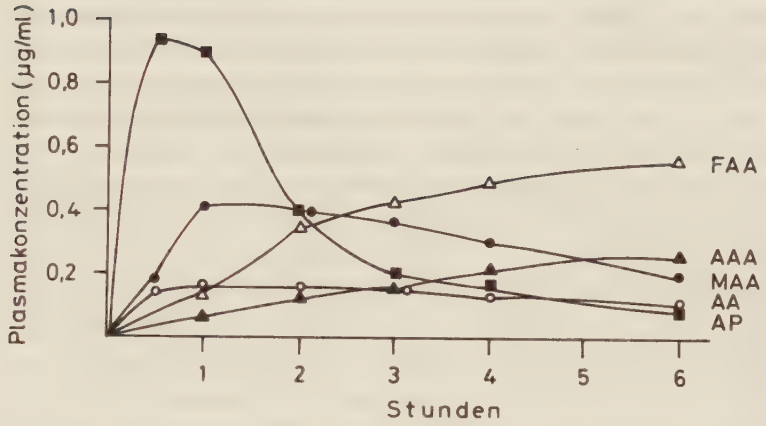


Abb. 29. Pharmakokinetik von Aminophenazon (AP) und seiner Metaboliten AA, AAA, FAA und MAA (siehe Abb. 28) (nach Breyer-Pfaff et al., 1982).

Einnahme des Medikaments fand sich die höchste Konzentration in Seren von Aminophenazon 0.9 µg/ml sowie des Metabolit MAA 0.2 µg/ml. 2 Stunden später war die Konzentration von Aminophenazon niedriger als die anderer Haupt-Metaboliten. Bei Verwendung der Reinsubstanz waren die höchsten 3H-TdR-Einbauraten bei Zusatz von 5 - 50 µg/ml (0.02 - 0.2 mM) zu beobachten. Diese Werte beziehen sich allerdings auf die eingewogenen Mengen, die tatsächliche Konzentration von Trägerprotein gebundenem Medikament in der Kultur ist wesentlich niedriger, möglicherweise ähnlich wie in "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren. Die Proteinbindungsrate von Aminophenazon liegt nur bei ungefähr 15 - 20 %, die von Propyphenazon ist höher, während Phenylbutazon fast vollständig (>90 %) an Proteine gebunden wird (Volz + Kellner, 1980). Die stärkste Lymphozytenproliferation gegenüber Propyphenazon wurde durch das 90-Minuten-Metaboliten-Serum ausgelöst, das hohe Konzentrationen von nicht metabolisiertem Wirkstoff und Metaboliten enthält (Volz + Kellner, 1980).

Es bestand ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des in vitro Tests nach den Reexpositionen und den "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren bzw. der Wirkstoffkonzentration, durch die die höchsten Reaktionen induziert werden konnten. 3 bzw. 4 Tage nach den Reexpositionen ließen sich maximale Lymphozytenreaktionen durch Seren auslösen, die 60 - 90 Min. nach Einnahme gewonnen worden waren bzw. durch eine relativ niedrige Wirkstoffkonzentration (5 µg/ml) in der Kultur. Dagegen fanden sich 2 - 3 Wochen später die höchsten Proliferationsraten bei Zusatz von "Medikament/Metabolit-haltigen" Seren, die 120 - 180 Min. nach Einnahme abgenommen worden waren, bzw. bei Zusatz höherer Wirkstoffkonzentration (50 µg/ml).

Eine Erklärung dieser Befunde ist schwierig. Aus Abbildung 29 geht hervor, daß eine Stunde nach Verabreichung von Aminophenazon eine maximale Konzentration des nicht metabolisierten Medikaments (AP) im Serum vorliegt. Der Metabolit MAA erreicht seine höchste Serumkonzentration 1 - 2 Stunden nach Einnahme, die anderen Metaboliten jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt. Nach einer Reexposition mit Aminophenazon kann es daher nur zu einer kurzfristigen Reaktion des Immunsystems mit dem nicht metabolisierten Medikament (AP) kommen und zu einer deutlich länger andauernden Interaktion mit den verschiedenen Metaboliten. Dies könnte zur Folge haben, daß nur für eine kurze Zeit gegenüber AP aktivierte Lymphozytenklone zirkulieren, die im LTT mit dem 60 Min.-"Medikament/Metabolit-haltigen" Serum oder einer niedrigen Aminophenazonkonzentration erfaßt werden können. Wenn deren Aktivität oder Konzentration einige Wochen später abgenommen hat, läßt sich eine signifikant erhöhte Proliferation nur mit 120 - 180-Minuten-Seren erzielen, durch die Lymphozytenklone gegen die verschiedenen Metaboliten stimuliert werden.

Die unterschiedlichen Konzentrationen der Wirkstoffe in der Lymphozytenkultur, die zu den verschiedenen Zeitpunkten für eine maximale Stimula[illegible]ion der Zellen notwendig waren, sind unter der Vorstellun[illegible] erklärbar, daß bei höherem Sensibilisierungsgrad unmittelbar nach einer Reexposition geringere

Testkonzentrationen ausreichen, damit es zu einer Interaktion mit der größeren Anzahl kompetenter Lymphozyten kommt. Eine erhöhte Medikamentkonzentration ist zu einem Zeitpunkt notwendig, an dem eine kleinere Zahl sensibilisierter Zellen zirkulieren. Möglicherweise binden sich die Wirkstoffe auch unspezifisch an den Membranen anderer Zellen (Parker, 1980).

Die Stimulationsraten variierten in diesen Untersuchungen zwischen 1.0 - 6.0. Es ist vorstellbar, daß diese Reaktionen z.B. durch Zusatz von humanen Mikrosomen insbesondere aus der Leber des Patienten mit den allergischen Symptomen stärker nachweisbar werden. Möglich ist auch, daß bei einem Teil der Patienten vor allem eine Sensibilisierung gegenüber Metaboliten besteht, die bei gesunden Individuen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration gebildet werden, so daß als optimale "Medikament-Antigen"-Quelle "Medikament/Metabolit-haltige" Seren der Patienten selber verwendet werden sollten (Gimenez-Camarasa et al., 1975).

In dieser Studie wurde die in vitro Immunantwort allerdings nur nach einmaliger Reexposition mit jeweils 100 mg Wirkstoff verfolgt. Es ist daher anzunehmen, daß die Sensibilisierung, die bis zu 3 Wochen nach den Reexpositionen im LTT erfaßbar war, schwächer ist als bei Patienten mit akuten allergischen Symptomen nach einer längeren Einnahme von den betreffenden Medikamenten. So waren bei den Patienten mit Fieberreaktionen nach unterschiedlich langer Einnahme von (+)-Katechin signifikant erhöhte Lymphozytenreaktionen bis zu einem Zeitraum von 24 Wochen zu beobachten. Die Immunantwort bei diesen Patienten war aber auch in den ersten 4 Wochen nach Absetzen des Medikaments am stärksten nachweisbar. Nach Reexposition mit (+)-Katechin ließ sich erneut eine Fieberreaktion und eine in vitro Immunantwort induzieren, die über einen Zeitraum von 7 Wochen nachweisbar war. Eine Erhöhung der Stimulationsraten konnte nach wiederholter Exposition nicht beobachtet werden.

Warrington fand sensibilisierte Lymphozyten im Lymphozytentransformationstest bei 6 von 7 Patienten mit einer Penicil-

linallergie sogar noch nach einem Zeitraum von bis zu 20 Jahren und bei Patienten mit Isoniazid-Allergie bis zu 18 Monate nach dem Auftreten der akuten Symptome (Warrington + Tse, 1979). Bei allergischen Reaktionen auf andere Medikamente wie Azetylsalicylsäure, Rifampizin oder Melphalan dagegen waren positive Reaktionen in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls nur vorübergehend für einen Zeitraum von wenigen Wochen nachweisbar (Warrington + Tse, 1979). Aus diesem Grunde ist der Zeitpunkt der Testung der Lymphozyten in vitro entscheidend für die Erfassung von sensibilisierten Lymphozyten neben der Verwendung des richtigen "Medikament-Antigens" und der geeigneten Konzentration. Die Zeitspanne eines positiven Nachweises spezifisch sensibilisierter Lymphozyten scheint auch von der Art der allergischen Reaktion abzuhängen und ist bei systemischen Erkrankungen größer als bei organspezifischen Erkrankungen (Berg + Brattig, 1981).

Die Stärke der Sensibilisierung hängt wahrscheinlich von der Immunogenität des Antigens ab, die bei Penicillin stark zu sein scheint und bei anderen so schwach ausgeprägt sein kann, daß sie im LTT nicht mehr nachweisbar ist (Warrington + Tse, 1979).

Die Evidenzen für den spezifischen in vitro Nachweis zellulärer Immunreaktionen mit Hilfe des Lymphozytentransformationstests sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Der in vitro Nachweis sensibilisierter Lymphozyten gegenüber Propyphenazon bei der Patientin mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf Pyrazolone stimmte mit der Hautreaktion sowie dem Auftreten akuter allergischer Symptome nach Reexposition überein. Die in vitro Lymphozytenreaktion auf Aminophenazon wie auch die allergischen Symptome nach Reexposition mit diesem Pyrazolonderivat waren bei der Patientin schwächer ausgeprägt als bei Propyphenazon. Die fehlende Hautreaktion auf Aminophenazon läßt sich möglicherweise mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit der einzelnen Tests erklären. Ähnlich fand sich eine Differenz zwischen den positiven

Tabelle 8. Validität der Ergebnisse im LTT

1. Dosiswirkungsbeziehung der Lymphozytenstimulation
2. Korrelation zwischen der Abhängigkeit der Stimulation von der Verwendung zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnener "Medikament/Metabolit-haltiger" Seren und der Konzentration von Medikament bzw. Metabolit (Pharmakokinetik)
3. Medikament-spezifische Reaktivität
4. Zeit-abhängige Reaktion im LTT
5. Korrelation mit Reaktionen im Hauttest und nach Reexposition mit dem Medikament
6. Signifikante Unterschiede zu Kontrollansätzen

in vitro LTTs auf Ilvico und der fehlenden Hautreaktion auf dieses Medikament. Dieser negative Hauttest bei gleichzeitiger positiver Hautreaktion auf Propyphenazon läßt sich wahrscheinlich damit erklären, daß Propyphenazon nur ein Bestandteil (25 %) des Medikaments Ilvico darstellt. Bei den Hautreaktionen im Scratchtest und den akuten Reaktionen wie Gesichtsödem, Urtikaria und Exanthem nach den Reexpositionen handelt es sich wahrscheinlich um eine Überempfindlichkeit vom Typ I, die vor allem IgE vermittelt sind, sowie vom Typ III, bei dem Immunkomplexe im Antigen-Überschuß wirken. Eine ausgeprägte Erhöhung der IgE Konzentration ließ sich im Serum der Patientin aber nicht feststellen. Fieber und Vaskulitis-ähnliche Symptome jedoch scheinen auch zellvermittelte Reaktionen (Typ IV) anzuzeigen und stimmen somit mit den zellulären in vitro Reaktionen überein. Medikamente können verschiedene Überempfindlichkeitsreaktionen (z.B. Typ I und Typ IV) alternativ oder simultan auslösen (Halpern et al.,

1967; Kownatzki, 1981; Raab, 1974). Die vorliegenden Untersuchungen sind mit der Annahme vereinbar, daß bei der Pyrazolon-Überempfindlichkeit der Patientin Reaktionen vom Typ I, Typ III und Typ IV beteiligt sind.

Auffälligerweise waren bei der Patientin im Zeitraum (5 Jahre) vor dem ersten Auftreten der Medikament-induzierten Überempfindlichkeitsreaktionen eine allergische Reaktion vom Typ I (Heuschnupfen) ausgeprägt. Im Laufe der Desensibilisierung mit Pollenantigenen nahmen die atopischen Symptome ab, aber gleichzeitig kam es zu einer Sensibilisierung gegenüber Pyrazolonen und den nachfolgenden allergischen Reaktionen.

Insgesamt sprechen die Reaktionen im Hauttest, nach den Reexpositionen sowie in der Lymphozytenkultur dafür, daß bei der Patientin eine durch Pyrazolonderivate induzierte Überempfindlichkeit vorliegt, die durch humorale und zellvermittelte Immunreaktionen verursacht wird. Insbesondere die eindeutigen Ergebnisse im LTT sprechen gegen anaphylaktoide (pseudoallergische) Reaktionen (Dukor et al., 1980; Kallos + Kallos, 1980; Kleinhans, 1981), die nicht-immunologisch bedingt sind, jedoch den Soforttypreaktionen ähneln. Bei den anaphylaktoiden Reaktionen scheint es zu einer direkten Freisetzung von Histamin, Serotonin und anderen Mediatoren sowie zu einer Komplementaktivierung zu kommen. Sie können z.B. durch Azetylsalicylsäure (Aspirin) ausgelöst sein, die über den Prostaglandinstoffwechsel wirkt (Ring, 1981). Hierbei können keine medikament-spezifischen Immunreaktionen nachgewiesen werden. Aspirin kann aber auch allergische Reaktionen auslösen, die wir und andere (Barna et al., 1980; Warrington + Tse, 1979) in vitro nachweisen konnten.

Über den Mechanismus der durch das Medikament ausgelösten Immunantwort besteht noch weitgehend Unklarheit. Zur Induktion der Immunreaktion ist es notwendig, daß das Medikamenthapten durch Bindung an ein Trägerprotein zum Antigen wird. Abbildung 30 zeigt vereinfacht ein Schema der Bildung von möglichen immunogenen medikamentösen Wirkstoffen, die in der Blutzirkulation vorkommen. Medikament und deren Metabolite

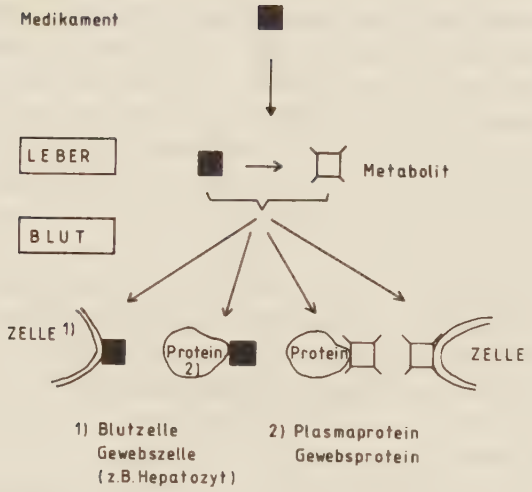


Abb. 30. Schema einer Bildung von Komplexen aus unverändertem Medikament oder Metabolit mit Proteinen oder Zellmembranen. Diese Hapten-Carrier-Komplexe können als Antigen auf das Immunsystem wirken.

können frei oder an Makromoleküle bzw. Zellmembranen gebunden zirkulieren, wobei angenommen wird, daß Metaboliten fester an Trägerproteine gebunden sind (Parker, 1980). Da medikamentös-allergische Reaktionen nur bei einem kleinen Teil der therapierten Patienten vorkommen, wird diskutiert, daß bei diesen Individuen genetisch bedingte Enzymdefekte vorliegen, sodaß ungewöhnliche Metaboliten oder veränderte Konzentrationen einzelner Metabolite und deren Komplexe mit Makromolekülen auftreten, die immunogen auf das Immunsystem wirken. Es ist diskutiert worden, daß in der Lymphozytenkultur das "Medikament-Antigen" durch Reaktion des Haptens mit Serumproteinen sowie Enzymen entsteht, die auch aus den kultivierten Zellen freigesetzt werden können (Parker, 1975b; Parker, 1977).

Neben den peripheren Reaktionen können Medikamente in vivo auch zentral auf das Immunsystem wirken und Immunreaktionen induzieren (Dameshek, 1967; Jaffe, 1981; Kirtland et al., 1980). So kann die Einnahme von D-Penicillamin zur Bildung von Autoantikörpern gegen Thymusepithelzellen führen, die mit Azetylcholinrezeptoren kreuzreagieren (Jaffe, 1981). Es ist diskutiert worden, daß das Medikament einen Toleranzverlust gegenüber Thymusepithelzellen bewirkt, der zur Folge hat, daß sogenannte "forbidden clones" Autoantikörper synthetisieren. Die Autoantikörperproduktion kann auf Grund einer eingeschränkten Suppressorzellfunktion oder einer erhöhten T-Helferzellenaktivität verursacht sein (Gershon, 1979; Talal, 1978). Ähnliche immunologische Mechanismen sind bei der alpha-Methyldopa-induzierten hämolytischen Anämie diskutiert worden (Kirtland et al., 1980).

Bei der Induktion der Immunantwort spielen Makrophagen und die durch sie aktivierten T-Helferzellen (T_H) eine zentrale Rolle. Nach Parker (1975a) ist das Hapten-bindende Makromolekül für die Interaktion von Immunzellen essentiell und es wird angenommen, daß die T-Helferzellen medikamentspezifische T- und B-Zellen stimulieren, die Antikörper oder Lymphokine freisetzen oder direkt zu zytotoxischen T-Zellen werden (Abb. 31). Bei allergischen Reaktionen auf ein Medikament müssen daher unabhängig vom Reaktionstyp (Typ I - Typ IV, z.B. IgE, IgG, Lymphozyten vermittelt) T-Helferzellen aktiviert sein, deren Proliferation im LTT wahrscheinlich bestimmt wird.

Neben den "Medikament-Antigen"-spezifischen Immunreaktionen wurden auch nicht-Antigen-spezifische Reaktionen untersucht, um zu prüfen, ob die Lymphozytenreaktivität nach der Reexposition verändert ist. Die Mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation, die Stimulation durch ubiquitäre Antigene sowie die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) war kaum alteriert. Nach Reexposition mit Aminophenazon fand sich dagegen bei der Patientin eine erhöhte ConA-induzierte Suppressorzellenaktivität und gleichzeitig eine starke Erniedrigung der PWM-induzierten IgG-Synthese. Die spontane IgG-Synthese

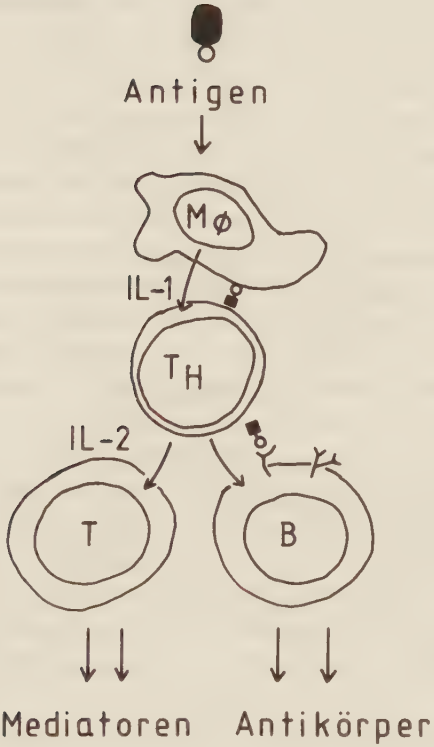


Abb. 31. Vereinfachte schematische Darstellung der Induktion einer Immunantwort durch ein Antigen (z.B. ein Trägerprotein gebundenes Medikament). Aktivierung von T-Helferzellen (T_H) durch das von Makrophagen (MØ) präsentierte Antigen und sezerniertes Interleukin 1 (IL-1) und Stimulation von T- und B-Effektorzellen durch das Antigen und von T_H freigesetztes Interleukin 2 (IL-2).

war auffälligerweise zum Zeitpunkt niedrigster PWM-induzierter IgG-Synthese erhöht. Dieser Befund des reziproken Verhaltens von Suppressorzellenfunktion und IgG-Synthese deutet auf einen Zusammenhang beider immunologischer Parameter hin. Es ist vorstellbar, daß im Ablauf einer Immunantwort auf ein

"Medikament-Antigen" nicht-"Medikament-Antigen"-spezifische Suppressorzellen aktiviert werden, wie es bei Infektionen gefunden wurde (Chisari et al., 1981).

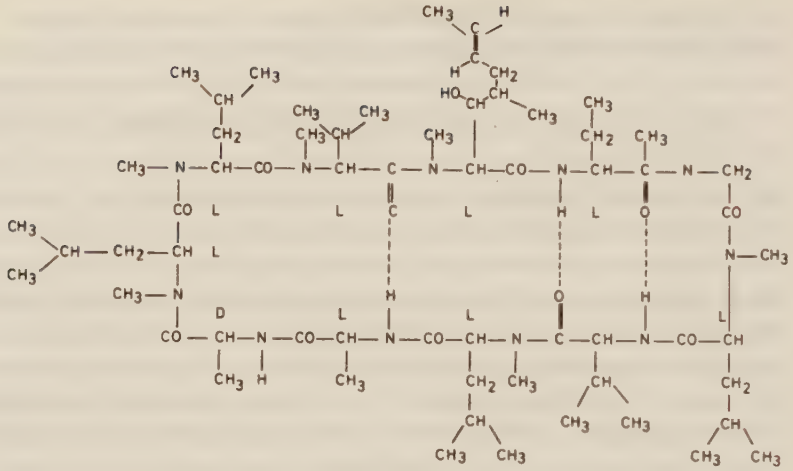
Die Untersuchungen bei den Patienten mit Fieberreaktionen auf (+)-Katechin haben die Ergebnisse der Studie der Patientin mit allergischen Reaktionen auf Pyrazolon bestätigt und ausgeweitet. Unter Anwendung derselben Kulturtechnik fand sich bei 9 von 14 Patienten ein positives Ergebnis im LTT, sodaß immunologische Prozesse auch bei diesen Patienten angenommen werden können. Die Induktionsperiode betrug in den meisten Fällen, ähnlich wie für andere Fieberreaktionen beschrieben (DeSwarte, 1980), 1 - 2 Wochen Einnahme des Medikaments. Die Fieberreaktion hielt 4 - 24 Stunden an. In einigen Fällen waren auch andere allergische Symptome zu beobachten wie Arthralgie oder Hautausschlag. Bei 3 Patienten fand sich ferner eine hämolytische Anämie. Es kann angenommen werden, daß sich der Wirkstoff direkt an Erythrozyten binden kann, die Bildung von Antikörpern induziert, die eine Lyse der Erythrozyten bewirken (Neftel et al., 1980). Für eine immunologische Reaktion spricht auch, daß in 5 von 8 reexponierten Patienten erneut Fieberreaktion ausgelöst wurde.

Die Fieberreaktion bei den Patienten nach Einnahme von (+)-Katechin kann durch lösliche Immunkomplexe aber auch durch zelluläre Immunreaktion ausgelöst worden sein. Trägergebundene Haptene können anti-Hapten-Antikörper induzieren, die mit dem Hapten lösliche Immunkomplexe bilden, Mediatoren der Anaphylaxie aktivieren und eine Freisetzung von endogenem Pyrogen aus Granulozyten oder Makrophagen bewirken (Atkin, 1960; Cluff + Johnson, 1964; Snell, 1972). So konnten wir bei 2/3 der Patienten mit (+)-Katechin induziertem Fieber erhöhte Konzentrationen von C_{1q}-bindenden Immunkomplexen im Serum feststellen (Ergebnisse nicht aufgeführt). Neftel et al. (1981) wies anti-Hapten-Antikörper bei den Patienten mit (+)-Katechin induziertem Fieber nach, die vor allem bei Patienten mit einer hämolytischen Anämie in hoher Konzentration vorkommen. Es zeigte sich, daß die anti-(+)-Katechin-

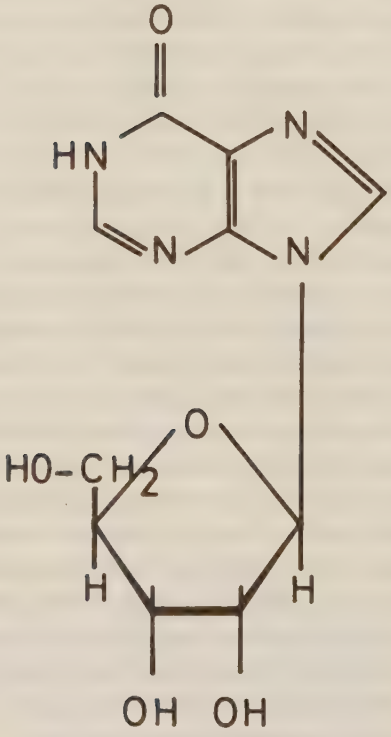
Antikörper mit anderen Flavonoid-Wirkstoffen wie Legalon oder Venoruton kreuzreagieren. Es sollte daher untersucht werden, ob die zelluläre Immunantwort spezifisch für (+)-Katechin oder wie die humorale Antwort spezifisch für Flavonoide ist.

In den bisher diskutierten Untersuchungen stand der Nachweis von "Medikament-Antigen" sensibilisierten Lymphozyten bei Patienten mit Verdacht auf Medikament-induzierten Allergien im Mittelpunkt. Medikamente können auch bei gesunden Probanden einen Einfluß auf die Immunreaktionen haben (Hadden, 1979). So fanden wir, daß die in vitro Lymphozytenreaktivität nach 10-tägiger Einnahme von Phenopyrazon-haltigen Venopyronum Dragees vorübergehend stark supprimiert wird (Brattig et al., 1981).

Wie die vorliegenden Untersuchungen einheitlich zeigten, hat CyA einen suppressiven, Inosin dagegen einen stimulierenden Effekt auf in vitro Immunreaktion. CyA ist ein zyklisches Peptid von 11 Aminosäuren aus dem Pilz Cylinerosporum lucidum booth und Trichodermapolysporin rifai (Abb. 32). Bereits sehr geringe Konzentrationen (0.1 - 1 µg/ml) inhibierten nach 6 Tagen die spontane Lymphozytenproliferation sowie die Antigen-Stimulation und MLR. Weniger stark war der Effekt auf die Mitogen-induzierte Transformation der Lymphozyten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen anderer Autoren überein. Gordon + Nouri (1981) fanden eine 60 - 70 %ige Inhibition der Mitogen-induzierten Proliferation, und Paavonen + Järveläinen (1981) konnten nachweisen, daß CyA in einer vergleichbaren Konzentration (0.1 - 10 µg/ml) die PWM- wie auch die durch Staphylokokkenprotein A induzierte Transformation von T- und B-Zellen supprimiert. Keine Inhibition wurde beobachtet, wenn die Lymphozyten bereits 2 - 4 Tage aktiviert waren, die Freisetzung von Immunglobulinen durch aktivierte Plasmazellen war ebenso nicht durch CyA beeinträchtigt. CyA scheint daher auf die Aktivierungsphase der Lymphozyten zu wirken. Ein Effekt von CyA auf die Phagozytose-Aktivität von peripheren Monozyten war nicht nachweisbar. Hess et al. (1981) beobachteten, daß CyA (1 µg/ml) die pri-



Cyclosporin A



INOSIN

Abb. 32. Strukturformel von Cyclosporin A und Inosin

märe und sekundäre MLR sowie die Induktion von zytotoxischen Zellen (CML) unterdrückt. Ihre Befunde sprechen dafür, daß die spezifische Alloantigenantwort durch Nylonwool-adhärente Suppressorzellen mit verursacht wurde, die möglicherweise durch CyA induziert werden. Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß CyA die Ausbildung Alloantigen- oder ConA-induzierter Suppressorzellen nicht unterdrückt (Gunn, 1981; Leapman et al., 1981).

Nach den bisherigen Untersuchungen ist anzunehmen, daß die PWM-induzierte Ig-Synthese T-Helferzellen abhängig ist (Hirano et al., 1977; Saxon et al., 1977), Staphylokokkus aureus Cowan I aber die B-Lymphozyten T-Zellen unabhängig stimuliert (Banck, 1982; Romagnani et al., 1980). Die vorliegenden Untersuchungen zeigen deutlich, daß CyA die IgM-Synthese nur nach PWM und nicht nach Staphylokokkus aureus Cowan I-Stimulation supprimierte. Diese Befunde stimmen mit der Beobachtung von Tosato et al. (1982) überein, daß CyA nur eine T-abhängige Immunglobulinsynthese inhibiert und daher wahrscheinlich nicht auf die B-zellen selbst wirkt.

Die Verhinderung einer Transplantatabstoßung durch CyA kann durch Induktion von Suppressorzellen zustandekommen (Hess et al., 1981; Wang et al., 1982) oder aber auch durch Hemmung von Alloantigen-induzierten zytotoxischen Zellen (Hess + Tutschka, 1980). So konnte bei Patienten mit primärer biliärer Zirrhose durch eine CyA-Behandlung eine Induktion von Suppressorzellen erreicht werden (Routhier et al., 1980). Der Mechanismus der CyA-induzierten Suppression von Immunreaktionen ist noch ungeklärt. CyA scheint vor allem auf T-Zellen zu wirken, möglicherweise auf bestimmte Subpopulationen wie T-Helfer- oder T-Suppressorzellen (Tosato et al., 1982). Eine Affinität von CyA für Membranen erklärt sich aus seiner lipophilen Natur. Einige Autoren postulieren einen spezifischen Rezeptor für CyA auf Lymphozyten (Ryttel et al., 1980) und eine Blockierung von Rezeptoren für DR-Antigen auf T-Zellen, so daß sich keine Rezeptoren für Interleukin-2 entwickeln können (Larsson, 1980; Palacios + Moller, 1981).

Im Gegensatz zu CyA führte der Zusatz von Inosin (1 - 100 µg/ml; Abb. 32) in den meisten Testsystemen zu einer Steigerung der Lymphozytenreaktivität. Eine Stimulation der Lymphozytenproliferation war nach 6-tägiger Inkubation ohne Aktivator stärker nachweisbar als nach 3 Tagen. Signifikante Steigerungen der Lymphozytenproliferation fanden sich auch bei Stimulation normaler Lymphozyten mit Mitogenen (PHA, PWM) und ubiquitären Antigenen im Gegensatz zur MLR. Ähnliche Ergebnisse liegen von anderen Autoren vor (Hadden et al., 1976; Klein et al., 1980; Morin et al., 1979; Wybran et al., 1978), die vor allem eine Steigerung der Mitogen- und Antigenstimulation nachweisen konnten, jedoch im Unterschied zu den vorliegenden Untersuchungen keinen Effekt auf die spontane Proliferation von Lymphozyten beobachteten (Hadden et al., 1976; Klein et al., 1980). Nach Hadden et al. (1976) und Morin et al. (1979) wirkt Inosin auf die Induktionsphase der Lymphozytentransformation.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß Inosin nur die spontane und PWM-induzierte Ig-Synthese verstärkte, dagegen keinen Effekt auf die Staphylokokkus aureus Cowan I-induzierte Ig-Sekretion hat. Inosin scheint daher, wie auch CyA, nur die T-Helferzellen abhängige Ig-Produktion zu beeinflussen und nicht auf die B-Lymphozyten selbst zu wirken. Ähnliche Beobachtungen sind bisher nicht beschrieben worden. Eine erhöhte Ig-Synthese ist nur in Tierexperimenten nachgewiesen (Glasky et al., 1975). Darüberhinaus liegen Befunde vor, die für eine Steigerung der Suppressorzellaktivität durch Inosin sprechen (Renoux et al., 1979; Touraine et al., 1979). Inosin verstärkt auch die Aktivität von Monozyten wie z.B. Phagozytose oder Abtöten von Listerien (Hadden + Giner-Sorolla, 1981). Eine erhöhte PHA-induzierte Lymphozytenproliferation von gesunden Probanden ist auch nach Einnahme von Inosin (50 mg/kg/Tag) feststellbar (Hadden et al., 1981). Bei Patienten mit Influenza oder Herpes simplex-Infektion war eine gesteigerte Virus-spezifische Immunantwort zu beobachten (Ginsberg + Glasky, 1977; Hadden et al., 1981;Settineri et al., 1976). Keine einheitlichen Ergebnisse fanden sich in

Tierversuchen, in denen der Einfluß von Inosin (Inosiplex, Inoprinosin) auf das Tumorwachstum untersucht wurde.

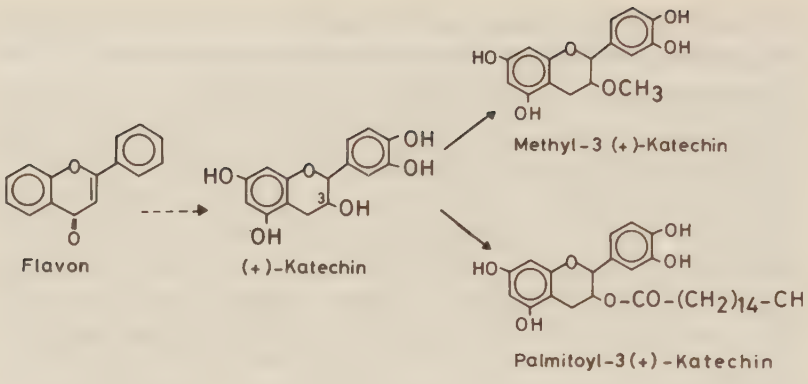
Der Mechanismus der Steigerung einer Immunantwort durch Inosin ist bisher nicht bekannt. Ein Einfluß von Inosin auf den zyklischen Nukleotid-Stoffwechsel (cAMP : cGMP) war nicht nachweisbar (Hadden et al., 1976). Inosin unterscheidet sich daher von anderen immunstimulierenden Wirkstoffen wie Lävamisol oder Thymopoetin, die die Konzentration von cGMP erhöhen. Inosin hat einen stimulierenden Effekt nicht nur auf die DNS-, sondern auch auf die RNS- und Protein-Synthese (Hadden, 1981).

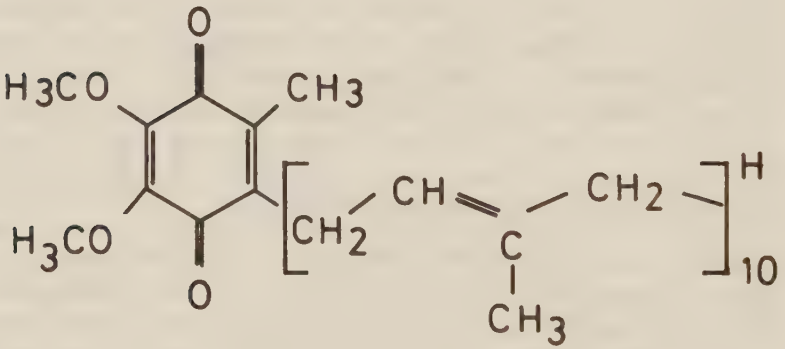
Während CyA einen immunsuppressiven Einfluß auf Immunfunktionen, Inosin dagegen einen stimulierenden Effekt hat, wirkten die Flavonoide, insbesondere Katechin und M-Kat, auf die spontane Lymphozytenproliferation und stärker noch auf die spontane sowie PWM- und Staphylokokkus aureus Cowan I-induzierte Ig-Synthese. Die Strukturformeln der Flavonoide und Ubichinon sind in Abbildung 33 dargestellt.

Signifikante Steigerungen fanden sich vor allem bei der 6 Tage spontanen Lymphozytenproliferation, weniger ausgeprägt nach 3 Tagen Inkubation sowie bei der PWM-induzierten Proliferation nach 6 Tagen. Die maximalen Erhöhungen waren bei Zusatz von 5 - 50 µg/ml in den meisten Fällen erreicht. In höheren Konzentrationen inhibierten die Flavonoidderivate, insbesondere P-Kat. Der stimulierende Einfluß von (+)-Katechin und M-Kat war stärker nachweisbar als bei dem P-Kat oder Ubichinon.

Die Stimulationsraten bei diesen Untersuchungen mit gesunden Probanden variierten zwischen 1.5 - 2.1 und lagen damit wesentlich niedriger als bei den Patienten mit (+)-Katechin Fieber (2 - 6.0).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden Despont + Brögger (1981) eine deutliche Steigerung der Lymphozytenproliferation nach 6 aber nicht 3 Tagen Inkubation, wobei allerdings nur (+)-Katechin und keine Derivate getestet wurden. Die Mitogenantwort war nur bei Spendern erhöht, die schwach





Ubichinon

Abb. 33. Die Strukturformeln der getesteten Flavonoide und Ubichinon.

stimulierbar waren ("low-responder"). Die Antigenstimulation war bei Individuen verstärkt, deren Lymphozyten auf diese ubiquitären Antigene reagierten. Nach den vorliegenden Untersuchungen wirken Katechin und M-Kat im Gegensatz zu CyA

und Inosin auf T- und B-Lymphozyten. So ließ sich in Gegenwart von 1 bzw. 5 µg/ml Katechin (M-Kat) eine erhöhte spontane und PWM-induzierte aber auch durch Staphylokokkus aureus Cowan I-stimulierte IgM- bzw. IgG-Synthese nachweisen.

Andere Autoren konnten einen stimulierenden Einfluß von (+)-Katechin auf die T-Rosettenbildung von normalen Lymphozyten (Sipos et al., 1981) oder die Antigenstimulierbarkeit der Lymphozyten von Patienten mit chronisch-aktiver Hepatitis beobachten (Yamamoto, 1981). Blum et al. (1977) berichteten von einer beschleunigten HBsAg-Elimination bei Patienten mit Hepatitis B nach Behandlung mit (+)-Cyanidanol-3 (Catergen^{R}). Es ist diskutiert worden, daß Katechin Immunreaktionen verstärken kann, die bei der Viruselimination beteiligt sind.

Der Mechanismus der stimulierenden Wirkung von Katechin ist nicht bekannt. In einer Untersuchung über den Einfluß von Flavonoiden auf den Nukleotidstoffwechsel konnte gezeigt werden, daß (+)-Katechin den Abbau von cGMP stärker inhibiert als von cAMP (Ruckstuhl et al., 1979). Ein stimulierender Effekt könnte daher durch höhere Konzentrationen von cGMP zustandekommen. Hennings (1979) wies eine Interaktion des Flavonoids mit ungesättigten Fettsäuren nach, wodurch der membranstabilisierende Einfluß von (+)-Katechin erklärt werden kann.

Die vorliegenden Untersuchungen sowie die Ergebnisse anderer Autoren machen deutlich, daß Medikamente Immunreaktionen positiv (Yang) oder negativ (Yin) beeinflussen können (Goldberg et al., 1974) und dadurch die Immunkompetenz alterieren. In Abb. 34 werden in einem Schema die positiven (+) oder negativen (-) Wirkungen von einigen Medikamenten oder pharmakologischen Substanzen auf die Entwicklung und Funktion von Immunzellen aufgeführt. Zu den immunstimulierenden Wirkstoffen gehören neben Lävamisol (Fisher et al., 1974; Levs et al., 1975; Renoux, 1978; Renoux + Renoux, 1971) und Inosin, Lynestrenol (Wybran, 1980), Pyran (McCord et al., 1976), Bestatin (Ishizuka et al., 1980; Oka, 1980), Tuftsin (Florentin et al., 1980), Azimexon (Hadden + Coffey, 1980)

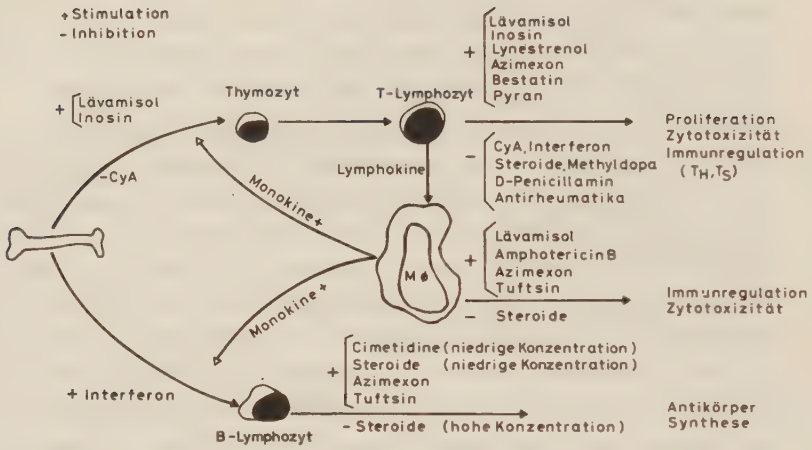


Abb. 34. Einfluß von einigen Medikamenten und pharmakologischen Substanzen auf die Entwicklung und Funktion von Immunzellen (nach Hadden, 1979; Bach, 1982 und Rees + Lockwood, 1982).

und Amphotericin B (Stewart et al., 1981), zu den immunsuppressiven Wirkstoffen neben CyA, D-Penicillamin (Lipsky + Ziff, 1978), Salicylat (Pachman et al., 1971), Azetylsalicylat (Panush + Anthony, 1976), Steroide (Rees + Lockwood, 1982), Aspirin (Crout et al., 1975; Opelz et al., 1973) sowie α-Methyldopa (Kirtland et al., 1980) und andere Anti-Rheumatika (Panush, 1976). Einige dieser Medikamente werden bei akuten und chronischen Infektionen, bei Immunmangel oder Tumor eingesetzt, um die Immunabwehr gegen infektiöse Keime oder Tumorzellen zu stärken. Immunsuppressive Wirkstoffe werden bei Transplantationen verwendet. Diese Untersuchungen machten deutlich, daß Medikamente, die primär andere therapeutische Wirkungen haben wie z.B. Analgetika, auf immunmodulierende Eigenschaften untersucht werden sollten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei Patienten mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf Medikamente durch den Nachweis arzneimittel-spezifischer zellulärer Immunreaktionen im Lymphozytentransformationstest (LTT) zwischen einer allergischen oder toxischen Reaktion unterschieden werden kann. Dies ließ sich an einer Gruppe von Patienten mit Catergen-induziertem Fieber und in einer Verlaufsstudie bei einer Patientin mit Pyrazolon-bedingten Überempfindlichkeitsreaktionen nachweisen. Die Sensibilität des Testsystems konnte erhöht werden durch gleichzeitige Verwendung verschiedener Konzentrationen in Serummilieu gelöster Pharmaka und "Medikament/Metabolit-haltiger" Seren, die von gesunden Probanden nach Einnahme der fraglichen Substanzen gewonnen worden waren. Spezifisch sensibilisierte Lymphozyten im peripheren Blut der Patienten waren am sichersten 2 - 4 Wochen nach der akuten Reaktion bzw. dem Absetzen der Arzneimittel erfaßbar.

Folgende Resultate wurden gewonnen:
Bei 9 von 14 Patienten mit Catergen-induziertem Fieber ließen sich 1 - 24 Wochen nach Absetzen des Medikaments signifikant ($P < 0.05 - 0.01$) erhöhte Lymphozytenproliferationsraten (Stimulationsindizes SI: 2 - 5.5) nachweisen. Bei 5 von 8 reexponierten Patienten kam es erneut zu Fieberreaktionen, und 4 dieser 5 Patienten reagierten im LTT, wobei die Stimulationsindizes nicht höher ausfielen als im ersten LTT.

Bei der Patientin mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf Pyrazolon-haltige Medikamente wie Ilvico, Optipect und Neosal konnten durch die Testung verschiedener Wirkstoffe Propyphenazon und gleichzeitig Aminophenazon induzierte allergische Reaktionen nachgewiesen werden (SI: 2 - 6). Bei den bei dieser Patientin parallel im Verlauf getesteten Lymphozytenfunktionen fand sich keine wesentliche Änderung der durch Mitogen oder ubiquitäre Antigene induzierten Lymphozy-

tenproliferation. Dagegen war die PWM induzierte Immunglobulinsynthese stark vermindert, während die ConA induzierbare Aktivität von Suppressorzellen leicht erhöht war.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden Untersuchungen über den Einfluß von Flavonoiden auf Immunreaktionen durchgeführt und mit der Wirkung der bekannten immunstimulierenden Substanz Inosin und dem immunsuppressiven Wirkstoff Cyclosporin A verglichen. Die Flavonoide Katechin, Methyl-Katechin und Palmitoyl-Katechin sowie Ubichinon erhöhten signifikant (30 - 80 % $P < 0.05$) die spontane Lymphozytenproliferation, beeinflußten jedoch kaum die Mitogen- oder Antigen-induzierte Transformation gesunder Lymphozyten. Katechin und Methyl-Katechin, nicht aber Palmitoyl-Katechin oder Ubichinon hatten einen eindeutig stimulierenden Einfluß auf die spontane, PWM sowie Staphylokokkus aureus Cowan I-induzierte in vitro Immunglobulinsynthese (30 - 120 % $P < 0.05$). Hierin unterschieden sich die Flavonoide von den Kontrollwirkstoffen Cyclosporin A und Inosin, die keinen Effekt auf die durch Staphylokokkus aureus Cowan I-induzierte IgM-Synthese hatten.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der LTT eine für Patienten äußerst schonende Untersuchungsmethode darstellt, mit der eine allergische Genese einer Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber Arzneimitteln vor allem dann erkannt werden kann, wenn der Test rechtzeitig durchgeführt wird. Ferner geht aus den Untersuchungen hervor, daß pharmakologische Substanzen auf mögliche immunmodulierende Eigenschaften getestet werden sollten.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Amos, H.E.: Laboratory investigation of an allergic drug reaction. In: Recent advances in clinical immunology (Ed. Thompson, R.A.) Churchill Livingstone, New York 1980, S. 221

Atkins, E.: Pathogenesis of fever. Physiol. Rev. 40: 580 (1960)

Bach, J.F.: Immunopotentiation. In: Clinical Aspects of Immunology (Eds. Lachmann, P.J. and D.K. Peters) Blackwell scientific publications, Oxford (1982) S. 565

Backer, J.T., E. Pioli, W. Jones-Williams: In vitro detection of hypersensitivity to tuberculous drugs. Lancet 2: 967 (1974)

Banck, G.: Staphylococcus aureus Cowan I and Branhamella Catarrhalis as B lymphocyte mitogens. Culture conditions for optimal DNA synthesis and selective stimulation of human B lymphocytes. J. Immunological Methods 51, 279 (1982)

Barna, B.P., P. Gogate, P. Deodhar, M. Moeder: Lymphocyte transformation and radioallergosorbent tests in drug hypersensitivity. Am. J. Clin. Pathol. 73, 172 (1980)

Bartel, J., E. Maier, B. Maisch, P.A. Berg: Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen mittels eines fluorometrischen C_{1q}-solid-phase-assays (FIAX). Lab. med. 5: 266 (1981)

Berg, P.A., N. Brattig: Role of immune mechanisms in drug induced diseases. In: M. Davis, J.M. Tredger, R. Williams: Drug reactions and the liver. Pitmann Medical Ltd. London, 105 (1981)

Blum, A.L., W. Doelle, K. Kortum, P. Peter, G. Strohmeyer, P. Berthet, H. Goebell, S. Pelloni, H. Poulsen and Tygstrup: Treatment of acute viral hepatitis with (+)-cyanidanol-3. Lancet 2, 1153 (1977)

Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (suppl. 97): 77 (1968)

Brattig, N., G.-J. Diao and P.A. Berg: (+)-Cyanidanol-3 induced fever and its pathogenesis. In: International Workshop on (+)-Cyanidanol-3 in Diseases of the Liver (Ed. Conn, H.O.) Royal Society of Medicine and Academic Press Inc. (London) Ltd., 227 (1981)

Brattig, N. and P.A. Berg: Immunosuppressive Serum Factor in viral hepatitis. I. Characterization of Serum Inhibition Factor as an antiactivator (submitted to Hapatology, 1982)

Breyer-Pfaff, U., M. Harder and E.H. Egberts: Plasma Levels of Parent Drug and Metabolites in the Intravenous Aminopyrine Breath Test. Eur. J. Clin. Pharmacol. 21: 521 (1982)

Bruce, D.L., F. Raymon: Test for halothane sensitivity. N. Engl. J. Med. 286: 1218 (1972)

Chisari, F.V., K.L. Castle, C. Xavier, D.S. Anderson: Functional properties of lymphocyte subpopulations in hepatitis B virus infection. I. Suppressor cell control of T lymphocyte res-onsiveness. J. Immunol. 126: 38 (1981)

Cluff, L.E., J.E. Johnson: Drug fever. Progr. Allergy, Vol. 8: 149 (1964)

Crout, J.E., B. Hepburn, R.E. Ritts: Suppression of lymphocyte transformation after aspirin ingestion. N. Engl. J. Med. 292: 221 (1975)

Dameshek, W.: Alpha-methyldopa red-cell antibody: cross-reaction or forbidden clones? N. Engl. J. Med. 276: 1382 (1967)

Davies, G.E., J.E. Holmes: Drug-induced immunological effects on the liver. Br. J. Anaesth. 44: 941 (1972)

Davis, P., A. Ezeoke: Immunological studies on the mechanisms of gold hypersensitivity reactions. Br. Med. J. 3: 676 (1973)

Despont, J.P. and R. Cornille Brögger: Influence of (+)-Cyanidanol-3 on Human Lymphocyte Proliferation In Vitro. In: International Workshop on (+)-Cyanidanol-3 in Diseases of the Liver (Ed. Conn, H.O.) Royal Society of Medicine and Academic Press Inc. (London) Ltd., 111 (1981)

DeSwarte, R.D.: Drug Allergy. In: Allergic Diseases (Ed. Patterson, R.). Philadelphia and Toronto, Lippincott Co., 452 (1980)

Dukor, P., P. Kallós, H.D. Schlumberger, G.B. West (Eds.): PAR: Pseudo-allergie Reactions - Involvement of Drugs and Chemicals, Vols. 1-3, Karger, Basel (1980)

Fisher, G.W., V.T. Oi, J.L. Kelley, J.K. Podgore, J.W. Bass, F.S. Wagner, and B.L. Gordon: Enhancement of host defence mechanisms against Gram-positive pyogenic infection with levotetramisole (levamisole) in neonatal rats. Ann. Allergy 33: 193 (1974)

Florentin, I., J. Schulz, M. Bruley-Rosset, N. Kiger, J. Martinez, and G. Mathe: In Vivo Immunomodulating Properties of Two Synthetic Agents: Azimexon and Tuftsin. In: Cancer Chemo- and Immunpharmacology (Eds. G. Mathe and F.M. Muggia) Berlin, Springer-Verlag, 153 (1980)

Gershon, R.K.: "Clonal selection and after," and after. N. Engl. J. Med. 300: 1105 (1979)

Gimenez-Camarasa, J.M., P. Garcia-Calderon, and J.M. de Moragas: Lymphocyte transformation test in fixed drug eruption. N. Engl. J. Med. 292: 819 (1975)

Ginsberg, T., A.J. Glasky: Inosiplex: An immunomodulation model for the treatment of viral disease. 3rd Conference on Antiviral Substances. Annals of the N.Y. Academy of Sciences 284: 128 (1977)

Glasky, A., E.H. Pfadenhauer, R. Settineri, and T. Ginsberg: Isoprinosine, a purine derivative metabolic, immunological and antiviral effects. In: Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency. (Eds. R. Pickering, B. Pollera, I. Porter, and H. Meuwissen) Academic Press Inc., New York (1975)

Goldberg, N.D., M.K. Hadden, E. Dunham, C. Lopez, J.W. Hadden: The Yin Yang hypothesis of biological control: opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP in the regulation of cell proliferation and other biological processes. In: Control of proliferation in animal cells, I. (B. Clarkson, R. Baserga, Eds.) Cold Spring Harbor Press, New York, 609 (1974)

Gordon, D., A.M.E. Nouri: Comparison of inhibition by glucocorticosteroids and cyclosporin A of mitogen-stimulated human lymphocyte proliferation. Clin. exp. Immunol. 44: 287 (1981)

Gunn, H.C.: Effect of cyclosporin A on the function of T cells. Transplant Vol. 32, No. 4, 338 (1981)

Hadden, J.W., R.G. Coffey, E.M. Hadden, E. Lopez-Corrales, G.H. Sunshine: Effects of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide levels. Cell. Immunol. 20: 98 (1975)

Hadden, J.W., E.M. Hadden, R.G. Coffey: Isoprinosine augmentation of phytohemagglutinin-induced lymphocyte proliferation. Infect. Immun. 13: 382 (1976)

Hadden, J.W.: The Immunopharmacology of Immunotherapy. Springer Semin. Immunopathol. 2: 35 (1979)

Hadden, J.W. and R.G. Coffey: Effects of BM12531 (Azimexon) on in Vitro Lymphocyte and Macrophage Proliferation. In: Cancer Chemo- and Immunopharmacology (Eds. G. Mathe and F.M. Muggia) Springer-Verlag, Berlin, 162 (1980)

Hadden, J.W. and A. Giner-Sorolla: Isoprinosine and NPT 15392: Modulators of Lymphocyte and Macrophage Development and Function. In: Augmenting Agents in Cancer Therapy (Eds. E.M. Hersh et al.) Raven Press, New York, 497 (1981)

Halpern, B.N., N.T. Ky, N. Amache: Diagnosis of drug allergy in vitro with the lymphocyte transformation test. J. Allergy Clin. Immunol. 40: 168 (1967)

Haynes, B.F. and A.S. Fauci: Activation of human B lymphocytes. III. Concanavalin A-induced generation of suppressor cells of the plaque-forming cell response of normal human B lymphocytes. J. Immunol. 118: 2281 (1977)

Hennings, G.: Zum molekularen Wirkungsmechanismus von (+)-Cyanidanol-3. Arzneim.-Forsch. Drug Res. 29, 5, 720 (1979)

Hess, A.D. and P.J. Tutschka: Effect of Cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. I. CsA allows for the expression of alloantigen-activated suppressor cells while preferentially inhibiting the induction of cytolytic effector lymphocytes in MLR. J. Immunol. 124: 2601 (1980)

Hess, A.D., P.J. Tutschka and G.W. Santos: Effect of cyclosporin A on human lymphocyte responses in vitro. J. Immunol. 126(3): 961 (1981)

Hirano, T., T. Kuritani., T. Kishimoto and Y. Yamamura: In vitro immune response of human peripheral lymphocytes. I. The mechanism(s) involved in T cell helper functions in the pokeweed mitogen-induced differentiation and proliferation of B cells. J. Immunol. 119: 1235 (1977)

Introna, M., P. Allavena, F. Spreafico and A. Mantovani: Inhibition of human natural killer activity by cyclosporin A. Transplantation 31: 113 (1981)

Ishizuka, M., J. Sato, Y. Sugiyama, T. Takeuchi and H. Umezawa: Mitogenic effect of bestatin on lymphocytes. J. Antibiot. 33: 653 (1980)

Jaffe, I.A.: Induction of auto-immune syndromes by Penicillamine therapy in rheumatoid arthritis and other diseases. Springer Semin. Immunopathol. 4: 193 (1981)

Kallós, P., L. Kallós: Histamine and some other mediators of pseudo-allergie reactions. In: "Pseudo-allergie reactions: Involvement of drugs and chemicals" (P. Dukor, P. Kallós, H.D. Schlumberger, G.B. West, eds.), Karger, Basel, 28 (1980)

Kirtland, H.H., D.N. Mohler and D.A. Horwitz: Methyldopa inhibition of suppressor-lymphocyte function. N. Engl. J. Med. 302: 825 (1980)

Klein, N., F. Fetta, M. Wangler: Positiver Effekt von Inosin auf die Antikörperantwort. Therapie Woche 30: 2463 (1980)

Kleinhans, D.: Diagnostik und Therapie pseudoallergischer (anaphylaktoider) Reaktionen. Allergologie 4: 184 (1981)

Kownatzki, E.: Reaktionsmechanismen der Allergie aus heutiger Sicht. Allergologie 4: 163 (1981)

Larsson, E.L.: Cyclosporin A and dexamethasone suppress T cell responses by selectively acting at distinct sites of the triggering process. J. Immunol. 124: 2828 (1980)

Leapman, S.B., R.S. Filo, E.J. Smith, P.G. Smith: Differential effects of cyclosporin-A on lymphocyte subpopulations. Transplant Proc. 13: 405 (1981)

Leoni, R., R.C. Carcia and A.C. Allison: Effects of cyclosporin A on human lymphocytes in culture. J. Clin. Lab. Immunol. 1: 67 (1978)

Levine, B.B., Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases in man. N. Engl. J. Med. 275: 1115 (1966)

Levs, Y., V. Rotter, and B. Ramor: Restoration of cellular immune response by levamisole in patients with Hodgkin's disease. Biomedicine 23: 198 (1975)

Lipsky, P.E. and M. Ziff: The effect of D-penicillamine on mitogen-induced human lymphocyte proliferation: synergistic inhibition by D-penicillamine and copper salts. Journal of Immunology 120: 1006 (1978)

Lipsky, P.E. and M. Ziff: Inhibition of human helper T cell function in vitro by D-penicillamine and $CuSO_4$. Journal of Clinical Investigation 65: 1069 (1980)

Mathews, K.P., P.M. Pan, J.H. Wells: Experience with lymphocyte transformation tests in evaluating allergy to aminosalicylic acid, isoniazid and streptomycin. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 42: 653 (1972)

McCord, R.S., M.K. Breinig, and P.S. Morahan: Antiviral effects of pyran against systemic infection of mice with herpes virus simplex type 2. Antimicrob. Agents Chemother. 10: 28 (1976)

Morin, A., C. Griscelli, F. Daguillard: Effects de l'isoprinosine sur l'activation des lymphocytes humains in vitro. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 130 C: 541 (1979)

Namihisa, T., K. Yamaguchi, N. Kitami, T. Yamada, Y. Takazakura, H. Hashimoto: Re-challenge test in patients with drug-induced hepatic injury of positive lymphocyte stimulation test. Jap. J. Gastroent. 71: 472 (1974)

Namihisa, T., K. Yamaguchi, N. Kitami: Der Lymphozytentransformationstest bei allergischen Arzneimittelschäden der Leber. Leber Magen Darm 5: 73 (1975)

Neftel, K.A., P. Diehm, H. Gerber, A.L. deWeck, P. Stucki: Durch (+)-Cyanidanol-3 (Catergen) induzierte immunhämolytische Anämie. Schweiz. med. Wschr. 110: 380 (1980)

Neftel, K.A., H. Japp, P. Diem and M. Wälti: (+)-Cyanidanol-3 induced immune haemolytic anaemia. In: International Workshop on (+)-Cyanidanol-3 in Diseases of the Liver (Ed. H.O. Conn) Royal Society of Medicine and Academic Press Inc. (London) Ltd., 223 (1981)

Oka, S.: A Review of Clinical Studies of Bestatin. In: Cancer Chemo- and Immunpharmacology (Eds. G. Mathe and F.M. Muggia) Springer-Verlag, Berlin, 126 (1980)

Opelz, G., P.I. Terasaki, A.A. Hirata: Suppression of lymphocyte transformation by aspirin. Lancet 2: 478 (1973)

Oppenheim, J.J., D.L. Rosenstreich: Lymphocyte transformation: utilization of automatic harvesters. In: In vitro methods of cell-mediated and tumor immunity (B.R. Bloom and J.R. David, Eds.) Academic Press, New York , 573 (1976)

Paavonen, T. and P. Hayry: Effect of cyclosporin A on T-dependent and T-independent immunoglobulin synthesis in vitro. Nature 287: 542 (1980)

Paavonen, T., H. Järveläinen, S. Kontiainen, P. Häyry: Effect of cyclosporin A on in vitro proliferative activity and immunoglobulin synthesis of isolated human lymphoid cell subpopulations. Clin. exp. Immunol. 43: 342 (1981)

Pachman, L.M., N.B. Easterly, R.D.A. Peterson: The effect of salicylate on the metabolism of normal and stimulated human lymphocytes in vitro. J. Clin. Invest. 50: 226 (1971)

Palacios, R. and G. Moller: Cyclosporin A blocks receptors for HLA-DR antigens on T cells. Nature 290: 792 (1981)

Panush, R.S.: Effects of certain antirheumatic drugs on normal human peripheral blood lymphocytes. Arthritis and Rheumatism 19: 907 (1976)

Panush, R.S., C.R. Anthony: Effects of acetylsalicylic acid on normal human peripheral blood lymphocytes. Inhibition of mitogen- and antigen-stimulated incorporation of tritiated thymidine. Clin. Exp. Immunol. 23: 114 (1976)

Parker, C.W.: Drug allergy (first of three parts). N. Engl. J. Med. 292: 511 (1975a)

Parker, C.W.: Drug allergy (third of three parts). N. Engl. J. Med. 292: 957 (1975b)

Parker, C.W.: Problems in identification of responsible antigenic determinants in drug allergy. In: Drug Design and Adverse Reactions (H. Bundgaard, P. Juul and H. Kofod, Eds.) Alfred Benzoin Symposium, X. New York, Academic Press (1977)

Parker, C.W.: Drug Allergy. In: Clinical Immunology (Ed. C.W. Parker) Saunders Co., Philadelphia, 1219 (1980)

Paronetto, F., H. Popper: Lymphocyte stimulation induced by halothane in patients with hepatitis following exposure to halothane. N. Engl. J. Med. 283: 277 (1970)

Pearsall, H.R., J. Ewalt, M.S. Tsoi et al.: Nitrofurantoin lung sensitivity: Report of a case with prolonged nitrofurantoin lymphocyte sensitivity and interaction of nitrofurantoin-stimulated lymphocytes with alveolar cells. J. Lab. Clin. Med. 83: 728 (1974)

Pownall, R., M.S. Knapp: Immune responses have rhythms: are they important? Immunology today 1: 7 (1980)

Raab, W.: Diagnostische Möglichkeiten bei Verdacht auf Arzneimittelallergie. Med. Klinik 69: 915 (1974)

Rees, A.J., C.M. Lockwood: Immunosuppressive drugs in clinical practice. In: Clinical Aspects of Immunology (Eds. Lachmann, P.J. and D.K. Peters) Blackwell scientific publications, Oxford, 507 (1982)

Renoux, G. and M. Renoux: Effect immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunisation des souris contre l'infection par Brucella abortus. C.R. Acad. Sci. (Paris) Série D 272: 349 (1971)

Renoux, G.: Modulation of immunity by levamisole. Pharmacol. Ther. 2: 397 (1978)

Renoux, R., M. Renoux, D. Degenne: Suppressor activity after isoprinosine treatment of lymphocytes from normal mice. Int. J. Immunopharmac. 1: 239 (1979)

Ring, J.: Ätiopathogenese pseudoallergischer (anaphylaktoider) Reaktionen. Allergologie 4: 174 (1981)

Romagnani, S., G.F. Delprete, E. Maggi, P. Falagiani and M. Ricci: T-cell independence of immunoglobulin synthesis by human peripheral blood lymphocytes stimulated with SpA-containing staphylococci. Immunology 41: 921 (1980)

Routhier, G., O. Epstein, G. Janossy, H.C. Thomas, S. Sherlock, P.C. Kung and G. Goldstein: Effects of cyclosporin A on suppressor and inducer T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. Lancet II: 1223 (1980)

Rubb, R.R.: On the use of drug re-challenge to substantiate drug induced hepatic injury. Gastroenterology 57: 767 (1969)

Ruckstuhl, M., A. Beretz, R. Anton and Y. Landry: Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. Biochemical Pharmacology 28: 535 (1979)

Ryttel, B., P. Donatsch, U. Götz, and M. Tschopp: Cyclosporin receptor on mouse lymphocytes. Immunol. 41: 913 (1980)

Sarkany, I: Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity. Lancet 1: 743 (1967)

Saxon, A., R.H. Stevens, and R.F. Ashman: Regulation of immunoglobulin production in human peripheral blood lymphocytes: cellular interactions. J. Immunol. 118: 1872 (1977)

Schneider, C.H., A.L. deWeck: The reaction of benzylpenicillin with carbohydrates at neutral pH with a note on the immunogenicity of hapten polysaccharide conjugates. Immunochemistry 4: 331 (1967)

Settineri, R., A. Rothman, T. Ginsberg, A.J. Glasky: Application of several tissue culture methods to the evaluation of antiviral action of a new drug: Inosiplex. California State University - Fullerton, and Newport Pharmaceuticals Int. (18th Symposium of California Branch of the Tissue Culture Association (1976))

Sheffer, A.L., R.E. Rocklin, E.J. Goetzl: Immunologic components of hypersensitivity reactions to cromolyn sodium. N. Engl. J. Med. 293: 1220 (1975)

Shulman, N.R.: Immunology reaction due to drug. New Engl. J. Med. 287: 408 (1972)

Sipos, J., V. Gábor, Z. Tóth, K. Bartók and P. Ribiczey: In Vitro Effect of (+)-Cyanidanol-3 on Rosette Formation International Workshop on (+)-Cyanidanol-3 in Diseases of the Liver (Ed. Conn, H.O.) Royal Society of Medicine and Academic Press Inc (London) Ltd., 113 (1981)

Snell, E.S.: Hypersensitivity fever. In: Mechanisms in Drug Allergy (C.H. Dash, H.E.H. Jones, Eds.) Williams and Wilkins, Baltimore (1972)

Stewart, S.J., P.J. Spagnuolo, and J.J. Ellner: Generation of Suppressor T lymphocytes and monocytes by Amphotericin B. J. Immunol. 127(1): 135 (1981)

Talal, N.: Autoimmunity and the immunologic network. Arthritis Rheum. 21: 853 (1978)

Tosato, G., S.E. Pike, I.R. Koski, R.M. Blaese: Selective inhibition of immunoregulatory cell functions by cyclosporin A. J. Immunol. 128: 1986 (1982)

Touraine, J.L., J.W. Hadden, F. Touraine: Isoprinosine induced T-cell differentiation and T-cell suppressor activity in man. 11th International Congress of Chemotherapy and 19th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston (1979)

Volz, M., H.M. Kellner: Kinetics and metabolism of Pyrazolones (Propyphenazone, Aminopyrine and Dipyrone). Br. J. clin. Pharmac. 10: 229S (1980)

Wang, B.S., E.H. Heacock, K.H. Collins, I.F. Hutchinson, N.L. Tilney, and J.A. Mannick: Suppressive effects of cyclosporin A on the induction of alloreactivity in vitro and in vivo. J. Immunol. 127: 89 (1981)

Wang, B.S., E.H. Heacock, C.X. Zheng, N.L. Tilney, T.B. Strom and J.A. Mannick: Evidence for the presence of suppressor T lymphocytes in animals treated with Cyclosporin A. J. Immunol. 128: 1382 (1982)

Warrington, R.J., K.S. Tse, B.A. Gorski, R. Schwenk and A.H. Sehon: Evaluation of isoniazid-associated hepatitis by immunological tests. Clin. exp. Immunol. 32: 97 (1978)

Warrington, R.J., K.S. Tse: Lymphocyte transformation studies in drug hypersensitivity. Can. Med. Assoc. J. 120, No. 9: 1089 (1979)

White, D.G., A.M. Plumb, G. Pawelec, and G. Brons: Cyclosporin A: an immunosuppressive agent preferentially active against proliferating T cells. Transplantation 27: 55 (1979)

Wybran, J., A. Govaerts, T. Appelboom: Inosiplex, a stimulating agent for normal human T cells and human leukocytes. J. Immunol. 121: 1184 (1978)

Wybran, J.: Lynestrenol: A Progesteronelike agent with immuno-stimulatory properties. In: Cancer Chemo- and Immunopharmacology (Eds. G. Mathé and F.M. Muggia) Springer-Verlag, Berlin, 180 (1980)

Yamamoto, S., H. Suzuki and T. Oda: Immunological Properties of (+)-Cyanidanol-3 (Abstract). In: International Workshop on (+)-Cyanidanol-3 in Diseases of the Liver (Ed. Conn, H.O.) Royal Society of Medicine and Academic Press Inc. (London) Ltd., 143 (1981)

Yamamura, M.: Standardization of lymphocyte transformation to phytohaemagg tinin. Clin. Exp. Immunol. 14: 457 (1973)

L e b e n s l a u f

Am 24.7.1949 wurde ich, Guo-jun Diao, als Sohn des Ren-ling Diao und der Ar-Cui Xu in Shanghai geboren. Von 1954-1960 besuchte ich die Grundschule in Shanghai und anschließend das Gymnasium bis zum Abitur im Mai 1966. Danach arbeitete ich in einem Krankenhaus von 1967 bis 1971. Ab 1972 studierte ich Medizin (Human) in der Hochschule für chinesische Medizin Shanghai. Am 5.5.1978 habe ich das Staatsexamen abgelegt. Dann arbeitete ich als Internist im Zhuyang Krankenhaus in Shanghai bis Februar 1980. April 1980 bin ich in die Bundesrepublik Deutschland gekommen, um mich in Immunologie weiter auszubilden. Unter der Leitung von Professor Dr. P.A. Berg begann ich an der Medizinischen Klinik Tübingen im Oktober 1980 mit immunologischen Untersuchungen über den Einfluß von Medikamenten auf das Immunsystem und über medikamentös-induzierte allergische Erkrankungen.